

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
РАСТЕНИЙ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК**

На правах рукописи

**Федяева Анна Валерьевна**



**ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И  
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРИ  
ТЕМПЕРАТУРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ И  
ДРОЖЖЕЙ**

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук, доцент**

**Побежимова Тамара Павловна**

**Иркутск-2015**

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Температурное воздействие и ответные реакции клеток растений.....	13
1.2. Синтез БТШ как ответная реакция клеток на изменение температуры.....	14
1.2.1. Синтез БТШ при тепловом воздействии.....	14
1.2.2. Роль активных форм кислорода в активации экспрессии БТШ.....	17
1.3. АФК как причина гибели клетки.....	19
1.3.1. Процессы, приводящие к гибели клетки.....	19
1.3.2. Типы гибели клеток и роль АФК.....	21
1.4. Типы и сайты продукции АФК в клетке.....	24
1.4.1. Типы АФК в клетке.....	24
1.4.2. Сайты продукции АФК.....	26
1.4.2.1. НАДФН-оксидаза (Rboh) (EC 1.6.3.1).....	26
1.4.2.2. Пероксидазы (EC 1.11.1.7).....	29
1.4.2.3. Хлоропласты.....	30
1.4.2.4. Пероксисомы.....	32
1.4.2.5. Митохондрии.....	32
1.5. Образование АФК компонентами дыхательной цепи.....	34
1.5.1. Комплекс I.....	36
1.5.2. Комплекс II.....	39
1.5.3. Комплекс III.....	39
1.5.4. Комплекс IV.....	42
1.5.5. Альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы.....	42
1.6. Продукция АФК и митохондриальный мембранный потенциал.....	44
1.7. Выводы из обзора литературы.....	47
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1. Объект исследования и условия культивирования.....	48
2.2. Температурное воздействие.....	49
2.3. Концентрации используемых агентов.....	50
2.4. Флуоресцентная микроскопия.....	50
2.5. Определение жизнеспособности.....	51

2.5.1. Определение жизнеспособности с использованием метода двойного окрашивания флуоресцентными красителями.....	51
2.5.2. Определение жизнеспособности по подсчету колониеобразующих единиц..	52
2.6. Определение содержания АФК .....	52
2.7. Определение электрохимического митохондриального мембранного потенциала .....	53
2.8. Выделение суммарного белка.....	54
2.9. Проведение электрофореза в ПААГе с ДДС-На.....	54
2.10. Окраска и обесцвечивание гелей .....	55
2.11. Вестерн-блоттинг .....	55
2.12. Статистическая обработка данных .....	56
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	57
3.1. Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток растений.....	57
3.1.1. Содержание БТШ при действии ряда повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника.....	57
3.1.2. Изменение уровня АФК при действии повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника.....	61
3.1.2.1. Тепловое воздействие вызывает усиление продукции АФК.....	61
3.1.2.2. Образование АФК в зависимости от интенсивности теплового воздействия .....	63
3.1.3. Изменение потенциала на внутренней мембране митохондрий при действии повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника .....	65
3.1.3.1. Тепловое воздействие вызывает повышение митохондриального мембранного потенциала .....	65
3.1.3.2. Повышение митохондриального мембранного потенциала в зависимости от интенсивности теплового воздействия в клетках озимой пшеницы .....	69
3.1.3.3. Повышение митохондриального мембранного потенциала в зависимости от интенсивности теплового воздействия в клетках сахарного тростника .....	69
3.1.3.4. Эффект СССР на изменение МП в клетках озимой пшеницы при температурных воздействиях различной интенсивности.....	71
3.1.4. Сравнение интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF после теплового воздействия различной интенсивности.....	73
3.1.5. Изменение интенсивности флуоресценции FDA при действии повышенных температур у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы.....	76

3.1.6. Изменение жизнеспособности клеток суспензионных культур при действии повышенных температур.....	78
3.1.6.1. Жизнеспособность клеток культуры озимой пшеницы в зависимости от интенсивности теплового воздействия.....	78
3.1.6.2. Жизнеспособность клеток культуры сахарного тростника в зависимости от интенсивности теплового воздействия.....	83
3.1.7. Изменения продукции активных форм кислорода, митохондриального потенциала и жизнеспособности культуры клеток озимой пшеницы в зависимости от продолжительности теплового воздействия 45 °С.....	88
3.1.8. Влияние протонатора СССР на продукцию АФК при тепловом воздействии у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы.....	90
3.1.9. Эффект хелатора кальция и ингибитора кальциевых каналов на изменение потенциала на внутренней мембране митохондрий и содержания АФК в культуре клеток озимой пшеницы.....	93
3.1.10. Изменение митохондриального потенциала и уровня АФК при холодном воздействии в культурах клеток озимой пшеницы и сахарного тростника.....	96
3.2. Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток дрожжей.....	99
3.2.1. Изучение изменения содержания АФК, потенциала на внутренней мембране митохондрий и жизнеспособности клеток <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при тепловом воздействии. Эффект аскорбиновой кислоты на изменение данных процессов.....	99
3.2.2. Эффект протонаторов на снижение содержания АФК и повышение устойчивости к тепловому воздействию в клетках дрожжей.....	104
3.2.3. Митохондрии являются основным сайтом продукции АФК в клетках дрожжей при тепловом воздействии.....	112
4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	116
4.1. Зависимость между интенсивностью теплового воздействия и синтезом БТШ ..	116
4.2. Синтез БТШ и продукция АФК при тепловом воздействии .....	118
4.3. Продукция АФК и гибель клеток при тепловом воздействии .....	119
4.4. Признаки ПКГ при действии повышенных температур у клеток растений .....	121
4.5. Митохондрии – источники АФК в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии .....	122
4.6. Митохондриальный мембранный потенциал при тепловом воздействии .....	125
4.7. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны и продукция АФК .....	128

4.8. Зависимость между повышением митохондриального потенциала и внутриклеточным кальциевым гомеостазом .....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
ВЫВОДЫ.....	136
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТФ – аденозин-5'-трифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- АП-ПКГ – апоптозо-подобная программируемая клеточная гибель
- ДНФ – 2,4-динитрофенол
- БТШ – белки теплового шока (Hsp, heat shock proteins)
- КОЕ – колониобразующая единица
- МП – митохондриальный потенциал
- мТАФК – митохондриальные активные формы кислорода
- НАДФН – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный
- нмБТШ – низкомолекулярные белки теплового шока
- ПКГ – программируемая клеточная гибель
- ФАД – флавинадениндинуклеотид
- ФМН – флавинмононуклеотид
- ФТШ – факторы теплового шока (Hsf, heat shock factors)
- ЭГТА – (этилендиокси)диэтилендинитрилтетрауксусная кислота
- ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
- СССР – карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone)
- FDA – флуоресцеин диацетат (fluorescein diacetate)
- H<sub>2</sub>DCF•DA – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
- JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)
- МО – «MitoTracker Orange CMTMRos», tetramethylrosamine
- PI – пропидий йодид (propidium iodide)
- Rboh – Respiratory burst oxidase homolog
- SDH – succinate dehydrogenase, сукцинатдегидрогеназа
- YEPD – питательная среда (yeast extract, peptone, dextrose)
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> – цитоплазматический кальций

$\text{H}_2\text{O}_2$  – пероксид водорода

$^1\text{O}_2$  – синглетный кислород

$\text{O}^{2\cdot-}$  – супероксид-радикал

$\text{HO}_2^\cdot$  – гидропероксил-радикал

$\text{OH}^\cdot$  – гидроксил-радикал

$\text{NO}$  – оксид азота

$\text{ONOO}^-$  – пероксинитрит

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Повышение содержания активных форм кислорода (АФК) является универсальной реакцией организма практически на любое стрессовое воздействие. Усиление генерации АФК до определенного уровня запускает синтез стрессовых белков, которые защищают клетку от гибели, а превышение этого уровня, наоборот, вызывает ее гибель [Rhoads et al., 2006; Колупаев, Карпец, 2009; Креславский и др., 2012]. В растительных клетках усиление генерации АФК может происходить за счет активации АФК-генерирующих ферментов, таких как НАДФН-оксидаза, пероксидаза и др., а также в результате функционирования хлоропластов и пероксисом [Минибаева, Гордон, 2003; Креславский и др., 2012; Колупаев, Карпец, 2009; Колупаев и др., 2012]. В нефотосинтезирующих или этиолированных органах растений, гетеротрофной культуре клеток, а также у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* одним из источников АФК в отсутствие стресса являются митохондрии [Møller et al., 2001; Rhoads et al., 2006; Rigoulet et al., 2011].

Усиление генерации АФК в клетках растений наблюдается при повышении температуры. АФК могут активировать экспрессию белков теплового шока (БТШ) или индуцировать гибель [Miller, Mittler, 2006; Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008; Locato et al., 2008; Колупаев, Карпец, 2009]. Установлено, что при тепловом воздействии в образовании АФК принимают участие митохондрии [Zhang et al., 2009; Schwärzlander et al., 2012; Рихванов и др., 2014]. Однако вклад митохондрий в продукцию АФК, а также механизм митохондриальной продукции АФК при тепловом воздействии остается во многом неизвестным.

В изолированных митохондриях сайтами образования АФК являются комплексы I и III дыхательной цепи [Møller et al., 2001; Rhoads et al., 2006; Гривенникова, Виноградов, 2013]. В то же время отсутствуют сведения, генерируют ли АФК комплексы I и III в клетках эукариот *in situ* [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Зоров и др., 2007]. Однако известно, что нарушение

функционирования митохондриальной альтернативной НАД(Ф)Н-дегидрогеназы (Ndb4) [Smith et al., 2011] и комплекса II [Gleason et al., 2011] подавляет митохондриальную генерацию АФК у растений.

Показано, что скорость генерации АФК в изолированных митохондриях млекопитающих в отсутствие стресса возрастает с повышением митохондриального потенциала [Korshunov et al., 1997]. Аналогичная ситуация наблюдается и в клетках млекопитающих, а снижение митохондриального потенциала, как правило, ингибирует продукцию АФК [Suski et al., 2012]. На основании результатов, полученных на изолированных митохондриях, В.П. Скулачев сформулировал гипотезу, согласно которой генерация АФК митохондриями при различных патофизиологических ситуациях происходит при повышении митохондриального потенциала (МП) на внутренней мембране митохондрий (гиперполяризации), в результате чего компоненты дыхательной цепи, например, убисемихинон, перевосстанавливаются [Skulachev, 1998]. Поскольку повышение генерации АФК митохондриями отмечается в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии [Zhang et al., 2009; Schwärzlander et al., 2012], то логично предположить, что причиной усиления генерации АФК при повышении температуры является гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны.

В гетеротрофной культуре растений отсутствуют хлоропласты, основной источник АФК в фотосинтезирующей клетке [Asada, 2006], поэтому суспензионная культура является удобной моделью для изучения роли митохондрий в образовании АФК. Идеальным объектом для решения этой проблемы являются дрожжи *S. cerevisiae*. Митохондриальные функции клеток дрожжей можно модулировать, выращивая их на сбраживаемых и несбраживаемых источниках углерода, а также в результате использования мутантов *petite*, у которых отсутствует митохондриальная ДНК. В связи с этим в настоящей работе изучали взаимосвязь между продукцией АФК и митохондриальным потенциалом при тепловом воздействии, используя

суспензионные культуры озимой пшеницы или сахарного тростника, а также клетки дрожжей. Для этого анализировали изменение содержания белков теплового шока (БТШ), уровень АФК, митохондриальный мембранный потенциал, а также жизнеспособность клеток при температурных воздействиях.

**Цель и задачи исследования.** Целью проведенного исследования являлось изучение взаимосвязи между изменением митохондриального мембранного потенциала, продукцией АФК, кальциевым гомеостазом, жизнеспособностью клеток растений и дрожжей при температурном воздействии.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Изучить изменение содержания АФК в клетках озимой пшеницы, сахарного тростника и дрожжей при температурном воздействии различной интенсивности.

2. Изучить роль митохондрий в генерации АФК в гетеротрофных клетках растений и дрожжей при температурном воздействии.

3. Оценить значение АФК в запуске гибели клеток растений и дрожжей при тепловом воздействии.

4. Исследовать взаимосвязь между изменением митохондриального мембранного потенциала и уровнем АФК в клетках растений и дрожжей при температурном воздействии.

5. Оценить роль клеточного кальциевого гомеостаза в изменении мембранного потенциала и продукции АФК при тепловом воздействии в культуре клеток озимой пшеницы.

**Научная новизна.** Впервые показано, что митохондрии являются одним из основных источников АФК при повышении температуры в гетеротрофной культуре клеток растений и дрожжей. Повышение продукции АФК при умеренном тепловом воздействии определяет гибель клеток, которая имеет признаки программируемой клеточной гибели. На ранней стадии теплового воздействия наблюдается гиперполяризация внутренней

митохондриальной мембраны, которая зависит от гомеостаза внутриклеточного кальция. На более поздней стадии теплового воздействия происходит деполяризация митохондриальной мембраны. Обнаружена причинно-следственная связь между усилением продукции АФК на ранней стадии теплового воздействия и гиперполяризацией митохондриальной мембраны.

**Теоретическая и практическая значимость.** АФК отличаются высокой реакционной способностью и являются причиной старения организма и его гибели в стрессовых условиях. Изучен механизм генерации АФК при тепловом воздействии в клетках растений и дрожжей и показана зависимость этого процесса от митохондриального мембранного потенциала.

Понимание причин, в результате которых образуются АФК в митохондриях, и факторов, влияющих на этот процесс, может помочь найти эффективные меры для защиты растений и животных от неблагоприятного эффекта чрезмерного образования АФК.

Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по генетике, экологии и физиологии растений, использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН.

**Положение, выносимое на защиту:**

Повышение генерации активных форм кислорода в клетках растений и дрожжей на ранней стадии теплового воздействия определяется повышением митохондриального мембранного потенциала и зависит от нарушений внутриклеточного кальциевого гомеостаза.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на Международной научно-практической конференции "Клеточная биология и биотехнология растений" (Минск, Беларусь, 2013), Всероссийской научной конференции "Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях" (Иркутск, 2013), 38-ом FEBS конгрессе (Petersburg, Russia, 2013), Первом международном симпозиуме "Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений" (Казань, 2013), Международной конференции

«Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013), Международной научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке» (Тамбов, 2013), Всероссийской научной конференции "Механизмы регуляции функций растительных органелл" (Иркутск, 2014), Международной конференции «Oxidative stress» (Parador de Oropesa, Spain, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста. Состоит из списка сокращений и основных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 35 рисунками. Список использованной литературы включает 201 источник.

## **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Температурное воздействие и ответные реакции клеток растений**

Одним из основных действующих на клетки растений абиотических воздействий является тепловое воздействие. Повышение температуры окружающей среды представляет собой серьезную угрозу для мирового растениеводства [Wahid et al., 2007]. При действии высоких температур происходит торможение роста и развития, повреждение стеблей и листьев растений [Bita, Gerats, 2013], что сопровождается снижением продуктивности сельскохозяйственных культур. На клеточном уровне при действии неблагоприятной температуры повреждаются мембраны, белки, нуклеиновые кислоты, нарушается функционирование органелл. Отклонение от оптимальной температуры оказывает значительное влияние на активность ферментов [Ruan et al., 2010], уровень метаболитов, фитогормонов и др. [Wahid et al., 2007]. Температурный стресс, как правило, сопровождается повышением уровня АФК, что приводит к окислительному стрессу [Suzuki, Mittler, 2006].

Чтобы не допустить повреждения в клетке активируется ответная реакция. Впервые изучение ответной реакции организма на тепловое воздействие на уровне транскрипционной активности началось с исследования Ritossa в 1962 году, который показал быстрое изменение генетической активности в ответ на повышение температуры (цитировано по [Park et al., 2005]). При тепловом воздействии наблюдается подавление синтезируемых в нормальных условиях белков и, наоборот, индуцируется экспрессия стрессовых белков [Wahid et al., 2007].

В зависимости от интенсивности теплового воздействия и ответных реакций клеток, используются различные понятия, применимые к температуре воздействия. Например, в работе [Park et al., 2005] авторы используют понятия мягкий и жесткий тепловой стресс в зависимости от температуры воздействия. Основным критерием, отличающим жесткий

тепловой стресс от мягкого теплового стресса, является то, что в первом случае происходит гибель клетки, а во втором случае, развивается процесс адаптации [Park et al., 2005]. Однако, как известно, гибель клетки может происходить активным образом в результате развития программируемой клеточной гибели (ПКГ) или пассивным – в результате некроза [Reare et al., 2008]. Поэтому в настоящей работе для теплового воздействия, которое не приводит к гибели клеток и при этом клетки адаптируются, будет использоваться определение «мягкое тепловое воздействие». Для теплового воздействия, при котором происходит развитие ПКГ, будет употребляться определение «умеренное тепловое воздействие». Для теплового воздействия, при котором наблюдается пассивная гибель клеток (некроз), будет применяться определение «жесткое тепловое воздействие». Для различных видов растений характерны свои температурные оптимумы жизнедеятельности. Например, верхним температурным порогом для нормального развития растений пшеницы является температура 26 °С, а для растений хлопка температура 45 °С [Wahid, 2007]. Соответственно, температурные условия, характеризующие «мягкое тепловое воздействие», «умеренное тепловое воздействие» и «жесткое тепловое воздействие» будут различаться в зависимости от вида растений.

## **1.2. Синтез БТШ как ответная реакция клеток на изменение температуры**

### ***1.2.1. Синтез БТШ при тепловом воздействии***

Повышение или понижение температуры приводит к изменению метаболизма клетки и развитию клеточного ответа. Одним из таких ответов клетки на тепловое воздействие является индукция синтеза белков теплового шока (БТШ; Hsp, heat shock proteins) [Wahid et al., 2007]. БТШ защищают другие белки от разрушительного действия повышенной температуры [Qin et al., 2008; Wang et al., 2014]. Однако БТШ продуцируются в клетке и в нормальных условиях. БТШ выполняют функции молекулярных шаперонов. Шапероны – это белки, главная функция которых состоит в восстановлении

правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов. Шапероны участвуют в биогенезе других клеточных белков, начиная с их синтеза на рибосомах и заканчивая сборкой мультимерных комплексов [Kubota et al., 2009; Mayer, 2010; Мельников, Ротанова, 2010].

БТШ были открыты в 1974 году [Tissieres et al., 1974], с тех пор выявлены различные классы БТШ у животных, растений и др. БТШ подразделяются на основании их молекулярной массы. Одним из хорошо изученных высокомолекулярных БТШ является Hsp101, который относится к семейству белков AAA+ (ATPases associated with various cellular activities). При тепловом воздействии в клетке образуются белковые агрегаты, Hsp101 участвует в дезагрегации данных комплексов [Lee et al., 2005]. Известно также об его участии в развитии термотолерантности у растений [Hong, Vierling, 2000]. Подобный белок обнаружен у дрожжей (Hsp104) и бактерий (ClpB) [Miot et al., 2011].

Другим семейством белков теплового шока являются белки Hsp90, которые обнаружены у различных организмов. Hsp90 являются высоко консервативными белками, которые участвуют в регулировании и поддержании правильной конформации различных белков в нормальных условиях, а также при действии стрессовых факторов. Белки Hsp90 играют роль в передаче сигнала при стрессе, включая роль в фолдинге протеинкиназ и транскрипционных факторов, а также активации субстратов для инициации передачи стрессового сигнала. Для различных видов растений обнаружено разное количество генов Hsp90. Например, 7 генов идентифицировано для арабидопсиса, 15 для растений сои, 9 и 12 для растений риса и кукурузы, соответственно [Xu et al., 2013].

В нормальных условиях одной из основных функций белков семейства Hsp70 является их участие в транспорте белков внутрь митохондрий и хлоропластов, а также в эндоплазматический ретикулум [Su et al., 2010]. Однако их синтез увеличивается при тепловом воздействии. Так например,

известно, что два представителя семейства Hsp70 (Ssa3 и Ssa4) у *S. cerevisiae* индуцируются в ответ на стресс [Kumar et al., 2014].

Помимо высокомолекулярных БТШ существует гетерогенная группа низкомолекулярных БТШ (нмБТШ), общим свойством которых является наличие консервативного С-терминального домена ( $\alpha$ -кристаллиновый домен) [Siddique et al., 2008].

Следует отметить, что у грибов и растений функционируют сходные высокомолекулярные и низкомолекулярные БТШ, которые участвуют в защите клетки от гибели при тепловом воздействии.

Индукции БТШ предшествует активация факторов теплового шока (ФТШ; Hsf, heat shock factors). Hsf контролируют экспрессию генов БТШ и функционируют как транскрипционные активаторы [Kotak et al., 2004]. Количество факторов теплового шока различается у разных видов растений. Так, в геноме арабидопсиса был определен 21 Hsf [Nover et al., 2001], в геноме риса – 23 Hsf [Kotak et al., 2004], в геноме томата – 18 Hsf, в геноме сои – 34 Hsf [Nishizawa et al., 2006], в геноме пшеницы – 56 Hsf [Xue et al., 2014]. У *S. cerevisiae* имеется единственный ФТШ – Hsf1p [Morano et al., 2012]. Растительные ФТШ подразделяются на несколько классов (А-С), классификация которых основана на наличии у них консервативного ДНК-связывающего домена и соседних олигомеризационных доменов (HR-A/B регион) [Nover et al., 2001]. Короткие пептидные мотивы обогащены ароматическими гидрофобными и кислотными аминокислотными остатками (АНА мотивы). АНА мотивы необходимы для связывания с промоторами генов БТШ. Факторы теплового шока класса В и С не имеют АНА мотивов и не обладают способностью самостоятельно активировать экспрессию генов [Nover et al., 2001]. Активированные Hsf в ядре взаимодействуют с *HSE* (*Heat shock element*), которые состоят из нескольких повторов последовательности nGAAn и представляют собой промоторные регионы генов – мишеней (БТШ) [Sakurai et al., 2010].

Экспрессия ФТШ активируется в ответ на действие биотических и абиотических факторов. Например, Lohmann с соавторами установили, что HsfA1a и HsfA1b являются ключевыми регуляторами в индуцированной тепловым шоком активации генной транскрипции Hsp83.1 и Hsp17.6 [Lohmann et al., 2004]. В работе Nishizawa-Yokoi с соавт. (2010) [Nishizawa-Yokoi et al., 2010] определили, что экспрессия ФТШ HsfA2 у арабидопсиса происходит в ответ на совместное действие повышенной интенсивности света и теплового шока. Таким образом, факторы теплового шока приводят к активации экспрессии генов белков теплового шока.

### ***1.2.2. Роль активных форм кислорода в активации экспрессии БТШ***

АФК активно участвуют в регуляции роста и развития растений и рассматриваются как важные молекулы, активирующие экспрессию стрессовых генов [Креславский и др., 2012]. При мягком тепловом воздействии, когда происходит синтез БТШ, одновременно наблюдается повышение уровня АФК [Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008]. В работе [Volkov et al., 2006] показано, что обработка  $H_2O_2$  в обычных условиях инкубации и мягкое тепловое воздействие ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) приводили к повышению экспрессии генов *HSP17.6*, *HSP18.2* у арабидопсиса. Это дало авторам основание полагать, что в процессе активации экспрессии БТШ участвует  $H_2O_2$ . Данное предположение было подтверждено в работе [Nishizawa et al., 2006]. Показано, что уровень транскриптов HsfA2 у арабидопсиса повышается при обработке  $H_2O_2$ . Добавление агентов, способных снижать генерацию АФК, подавляет экспрессию БТШ при тепловом стрессе, что доказывает роль АФК в активации экспрессии генов при тепловом воздействии. Добавление антиоксиданта – аскорбиновой кислоты, а также ингибитора флавин-содержащих ферментов – дифенилениодония хлорида ингибировало генерацию АФК при тепловом воздействии и значительно снижало уровень экспрессии БТШ в клетках арабидопсиса [Volkov et al., 2006; Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013], табака [Königshofer et al., 2008] и в клетках дрожжей [Moraitis, Curran, 2004]. Инактивация ферментов, которые

участвуют в детоксикации АФК, повышала содержание АФК и увеличивала экспрессию БТШ в отсутствие стресса. Так, показано, что в клетках арабидопсиса и табака подавление экспрессии генов, кодирующих аскорбатпероксидазу, в отсутствие стресса повышало экспрессию БТШ, в том числе *HSP70* и *HSP101* [Pnueli et al., 2003; Davletova et al., 2005; Ishikawa et al., 2005].

Участие ФТШ в развитии защитной программы на тепловое воздействие не ограничивается активацией экспрессии генов, кодирующих БТШ. Очевидно, что Hsf может активировать экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты. Делеция гена, кодирующего *HSFA2*, повышала уровень образования АФК в протопластах арабидопсиса [Zhang et al., 2009].

Для активации экспрессии генов БТШ необходимо связывание ФТШ с элементом *HSE*, находящимся в промоторах генов БТШ. Очевидно, что повышение генерации АФК при тепловом воздействии играет важную роль в связывании ФТШ и *HSE*. Показано, что в клетках животных обработка  $H_2O_2$  вызывает связывание Hsf с *HSE* [Becker et al., 1990; Jacquier-Sarlin, Polla, 1996; Zhong et al., 1998]. Аналогичное событие происходит в клетках растений. Тепловое воздействие и обработка  $H_2O_2$  приводили к связыванию белковых высокомолекулярных комплексов *Arabidopsis thaliana* с элементом *HSE*. Добавление агентов, снижающих образование АФК – аскорбиновой кислоты и дифенилениодония хлорида, подавляло образование таких комплексов [Volkov et al., 2006]. В работе Ahn и Thiele [2003] показано, что для активации ФТШ в клетках млекопитающих необходимо наличие двух остатков цистеина, которые при тепловом воздействии и при обработке  $H_2O_2$  образуют дисульфидную связь, в результате чего Hsf олигомеризуется, транспортируется в ядро, где связывается с *HSE* и активирует экспрессию генов БТШ [Ahn, Thiele, 2003].

На активацию ФТШ значительное влияние оказывает фосфорилирование и дефосфорилирование определенных аминокислотных

остатков. Вероятно, АФК могут активно влиять на этот процесс, окисляя цистеиновые остатки протеинкиназ и протеинфосфатаз [Колупаев, Карпец, 2009]. Показано, что понижение экспрессии аскорбатпероксидазы в клетках табака приводило к повышению генерации АФК и конститутивной активации митоген активируемой протеинкиназы с молекулярным весом 46 кДа [Ishikawa et al., 2005].

Результаты, полученные в работах [Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013], указывают, что АФК играют важную роль в распространении системного сигнала по всему растению или в системной приобретенной устойчивости (systemic acquired resistance, SAR) при тепловом воздействии. В этих работах было показано, что синтез БТШ наблюдается не только в листе, непосредственно подвергнутом тепловому воздействию, но и в других листьях растения, которые тепловому воздействию не подвергались. Источником сигнала, который может передаваться по всему растению, являются АФК, поскольку добавление агентов, нейтрализующих АФК, таких как каталаза и дифенилениодоний хлорид, подавляло экспрессию БТШ в удаленных частях растения [Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013; Baxter et al., 2014].

### **1.3. АФК как причина гибели клетки**

#### ***1.3.1. Процессы, приводящие к гибели клетки***

Повышение концентрации АФК до определенного уровня запускает синтез белков стресса, которые защищают клетку от гибели, а превышение этого уровня, наоборот, вызывает ее гибель [Rhoads et al., 2006; Колупаев, Карпец, 2009; Креславский и др., 2012]. Известно, что АФК являются высокореактивными соединениями, которые помимо выполнения сигнальных функций способны наносить вред биологическим структурам и нарушать физиолого-биохимические процессы клетки. АФК повреждают белки (окисление – SH-групп, FeS-центров ферментов, фрагментация пептидных цепей, повышение чувствительности белков к действию протеаз), нуклеиновые кислоты (повреждение азотистых оснований, дезоксирибозы,

рибозы, появление новых ковалентных связей). Липиды также являются мишенью АФК. При действии АФК на липиды наблюдается перекисное окисление липидов, что приводит к нарушению функционирования мембран, повышению их проницаемости для ионов и органических веществ [Минибаева, Гордон, 2003; Гарифзянов и др., 2011]. Показано, что тепловое воздействие на клетки табака вызывает увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов, 4-гидроксиалкеналя, малонового диальдегида и др., повышение содержания окисленных белков [Locato et al., 2008].

Существует много работ, указывающих на то, что повышение уровня АФК в клетке при тепловом воздействии является одной из причин ее гибели. В работе [Vacca et al., 2004] температурное воздействие 55 °С приводило к «отсроченной», или развивающейся во времени, гибели клетки с одновременной сверхпродукцией АФК. Подобные данные получены и в работе [Locato et al., 2008]. Мягкое тепловое воздействие (35 °С) приводило к повышению уровня АФК в клетках табака. Гораздо более сильное повышение уровня АФК наблюдалось при тепловом воздействии 55 °С, которое вызывало отсроченную гибель клеток.

На важную роль АФК в развитии гибели клетки при тепловом воздействии указывают работы, в которых использовались нокаутные мутанты по антиоксидантным ферментам. Показано, что при воздействии засухи и теплового шока у мутантов *A. thaliana*, дефицитных по аскорбатпероксидазе (APX1), повышалось содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и возрастала гибель [Koussevitzky et al., 2008]. Детоксикация АФК при обработке каталазой [Doyle, McCabe, 2010] и аскорбиновой кислотой [Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2012] подавляла гибель клеток арабидопсиса во время действия теплового шока.

В то же время следует отметить, что в литературе имеются противоречивые данные о связи между уровнем АФК и развитием гибели в клетках растений при тепловом воздействии. Как было отмечено выше,

инактивация аскорбатпероксидазы усиливала гибель клеток арабидопсиса при тепловом воздействии [Koussevitzky et al., 2008]. В то же время подавление экспрессии генов, кодирующих аскорбатпероксидазу в клетках табака, наоборот, защищало растения от гибели [Ishikawa et al., 2005]. Очевидно, такие противоречия можно объяснить тем, что в одном случае АФК действуют как индукторы экспрессии БТШ и поэтому защищают растения от гибели. В другом случае АФК являются фактором повреждения растительного организма и поэтому усиливают гибель.

### ***1.3.2. Типы гибели клеток и роль АФК***

При сильном стрессовом воздействии клетка, как правило, погибает. Гибель клетки происходит различными путями. Ряд авторов на основании наблюдаемых событий, приводящих к гибели, по-разному классифицируют типы гибели клетки. Например, Reare в своей работе [Reare et al., 2008] выделяет следующие основные пути клеточной гибели у растений: апоптоз (подобные термины – программируемая гибель клеток, ПКГ; апоптозо-подобная программируемая клеточная гибель, АП-ПКГ), некроз и аутофагия. Другие авторы (van Doorn с соавторами), основываясь на морфологических и биохимических признаках гибели клеток растений, полагают, что существует всего два типа гибели клеток: вакуолярная и некротическая клеточные гибели [van Doorn et al., 2011].

Тем не менее, большинство исследователей одним из основных путей гибели считают гибель, проходящую по пути апоптоза. Апоптоз или ПКГ, по мнению ряда авторов [Reare et al., 2008], характеризуется определенными признаками. В животных клетках для апоптоза характерны следующие морфологические признаки: конденсация хроматина, сжатие клетки, изменение морфологии митохондрий, распад ядра, фрагментация клетки на дискретные апоптотические тельца и, в конечном итоге, гибель клетки [Kroemer et al., 2009]. Кроме морфологических и ядерных изменений, апоптоз может характеризоваться биохимическими и молекулярными изменениями: увеличением концентрации свободного цитозольного кальция, развитием

окислительного взрыва, повышением пула восстановленного глутатиона, снижением митохондриального мембранного потенциала. При этом происходит выход митохондриальных белков (например, цитохрома *c*) в цитозоль, что приводит к активации каскада протеаз, в том числе и семейства цистеиновых протеаз-каспаз, участвующих в деградации клетки [Reare, 2008].

У клеток животных и растений существуют различия в строении и функционировании, поэтому ПКГ у растений отличается от ПКГ у животных. Наличие у растительных клеток структур, обеспечивающих тургор клетки (жесткая клеточная стенка и вакуоль), не позволяет формировать апоптотические тельца в процессе ПКГ. Также у растений не происходит фагоцитоза [Logan, 2008]. Апоптоз у растений в основном приводит к конденсации протопласта с отставанием его от клеточной стенки. Вакуоль также служит местом локализации многих протеолитических ферментов, принимающих участие при развитии апоптоза. Также отличительной особенностью растительных клеток является наличие пластид и объединение протопластов всех клеток с помощью плазмодесм в единую систему – симпласт. Кроме того, у растений нет «классических» животных каспаз, однако есть каспазо-подобные протеазы [Tsiatsiani et al., 2011]. Данные признаки отличают апоптоз растений от такового у животных. ПКГ у растений часто называют АП-ПКГ, которая может происходить при нормальных условиях (например, на определенных этапах онтогенеза) или индуцироваться при действии абиотических или биотических стрессоров.

Увеличение продукции АФК наблюдается при развитии ПКГ у клеток животных, дрожжей и растений [Circu, Aw, 2010]. В работах с использованием культуры клеток табака показано, что тепловое воздействие приводило к повышению уровня АФК [Vacca et al., 2004, 2006; Locato et al., 2008]. Параллельно с увеличением генерации АФК происходит развитие признаков ПКГ, а именно: конденсация протопласта и хроматина [Vacca et al., 2004], «лестница» ДНК [Vacca et al., 2004; Locato et al., 2008], выход

цитохрома *c* из митохондрий [Vacca et al., 2006], окисление липидов и белков, увеличение содержания окисленных форм аскорбиновой кислоты и глутатиона [Locato et al., 2008]. Добавление антиоксидантных ферментов во время теплового воздействия подавляло выход цитохрома *c* из митохондрий табака [Vacca et al., 2006]. Однако эффект АФК на развитие ПКГ при тепловом воздействии является неоднозначным. Показано, что добавление каталазы подавляло гибель клеток при развитии ПКГ в культуре клеток арабидопсиса, подвергнутых тепловому воздействию. А добавление аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона, наоборот, стимулировало гибель [Doyle, McCabe, 2010].

Другим типом гибели клетки является некроз. Некроз описывают как хаотичную, неконтролируемую клеточную смерть [Reare et al., 2008]. При сильных стрессовых воздействиях клетка погибает путем некроза. Гибель происходит мгновенно, при этом признаков, характерных для АП-ПКГ, не наблюдается. У растительных клеток при некрозе иногда происходит быстрое отставание протопласта и ранний разрыв цитоплазматической мембраны [van Doorn et al., 2011]. В клетках растений при патогенной атаке одним из ранних клеточных событий является окислительный взрыв, который может приводить к некрозу [Desikan et al., 1998].

Кроме вышеуказанных форм гибели (АП-ПКГ и некроз), для растений описана аутофагия. Термин «аутофагия» или «самопоедание» клетки используется в случае, когда цитоплазматические материалы деградируются при участии лизосом (животные клетки). Гибель клетки путем аутофагии может происходить в процессе нормального развития, а также при действии стрессовых факторов [Klionsky, 2005]. Такой тип гибели характеризуется, главным образом, формированием аутофагических вакуолей, а также изменением формы митохондрий и эндоплазматической сети и небольшим увеличением аппарата Гольджи [Reare et al., 2008]. Показано, что АФК участвуют в активации аутофагии [Xie et al., 2012].

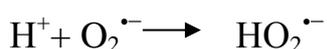
## 1.4. Типы и сайты продукции АФК в клетке

### 1.4.1. Типы АФК в клетке

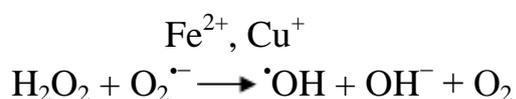
Во всех живых организмах протекают окислительно-восстановительные реакции, побочным продуктом которых являются АФК [ApeI, Hirt, 2004].

Среди образующихся АФК в клетке выделяют следующие: синглетный кислород ( $^1\text{O}_2^*$ ), супероксид-радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), гидропероксил-радикал ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гидроксил-радикал ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) [Asada, 2006]. Также при участии молекулярного кислорода могут образовываться так называемые активные формы азота: оксид азота ( $\text{NO}$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) [Turrens, 2003].

- синглетный кислород ( $^1\text{O}_2^*$ ).  $^1\text{O}_2^*$  образуется в процессе фотоингибирования [Hasanuzzaman et al., 2013] и с участием фотосистемы II в процессе фотосинтеза [ApeI, Hirt, 2004; Asada, 2006; Hasanuzzaman et al., 2013].
- супероксид-радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).  $\text{O}_2^{\bullet-}$  может образовываться в процессе фотосинтеза в хлоропластах (реакция Миллера).  $\text{O}_2^{\bullet-}$  также образуется в митохондриях [Navrot et al., 2007] и является главным нежелательным побочным продуктом, образующимся в процессе окислительного фосфорилирования. Также генерация  $\text{O}_2^{\bullet-}$  происходит в матриксе пероксисом и на их мембране [del Río et al., 2006] и является следствием нормального метаболизма пероксисом. Кроме того, в продукции  $\text{O}_2^{\bullet-}$  участвуют НАДФН-оксидазы плазмалеммы и ксантинооксидаза [Hasanuzzaman et al., 2013].
- гидропероксил-радикал ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). При низких значениях pH  $\text{O}_2^{\bullet-}$  практически не проявляет активности сам по себе, но инактивирует белки или вызывает перекисное окисление липидов в своей протонированной форме  $\text{HO}_2^{\bullet}$ . Образование  $\text{HO}_2^{\bullet}$  происходит за счет протонирования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [Медведев, 2013]:



- пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может образовываться из O<sub>2</sub><sup>•-</sup> в хлоропластах с участием фотосистемы I (ФСI) и митохондриях с помощью супероксиддисмутазы [Asada et al., 2006; Navrot et al., 2007]. Также H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может образовываться в пероксисомах [del Río et al., 2006]: в процессе фотодыхания (реакция окисления гликолата), β-окисления жирных кислот, ферментативной реакции флавин-оксидаз, диспропорционирования O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [del Río et al., 2006].
- гидроксил-радикал (•OH) и гидроксил ион (OH<sup>-</sup>). •OH образуется в реакции *Хабера-Вайса*, которая протекает в присутствии ионов железа (Fe<sup>2+</sup>) или меди (Cu<sup>+</sup>):



Реакция Хабера-Вайса может быть разделена на два этапа:

1. *Реакция Фентона*, в которой •OH образуется из H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с участием металлов с переходной валентностью в хелатированной форме (Fe<sup>2+</sup> или Cu<sup>+</sup>):



2. Fe<sup>3+</sup>-комплекс может эффективно восстанавливать O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, обеспечивая таким образом цикличность реакции Фентона [Медведев, 2013]:



Таким образом, в клетке продуцируются различные формы АФК и существуют многочисленные компоненты антиоксидантной защиты, которые их обезвреживают. В работе [Прадедова и др., 2011] предложено несколько принципов классификации систем антиоксидантной защиты. Один из принципов предполагает существование трех групп антиоксидантов. Первая группа антиоксидантов, включающая ферритин, трансферрин, альбумин, препятствует образованию АФК в результате хелатирования металлов с переменной валентности. Вторая группа включает в себя ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) и неферментативные (аскорбиновая кислота, глутатион, токоферол,

флавоноиды) антиоксиданты, которые подавляют развитие свободнорадикальной реакции. Третья группа антиоксидантов участвует в исправлении повреждений, например, глутатион-S-трансфераза [Прадедова и др., 2011].

#### **1.4.2. Сайты продукции АФК**

Основными сайтами генерации АФК в растительной клетке являются НАДФН-оксидазы, хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и связанные с клеточной стенкой пероксидазы. Помимо указанных систем АФК могут образовываться в результате функционирования таких ферментов как гликолатоксидаза, оксалатоксидаза, аминоксидаза, ксантинооксидаза, цитохром P450-зависимая оксигеназа, а также при  $\beta$ -окислении жирных кислот [Mittler, 2002; Mittler et al., 2004].

##### **1.4.2.1. НАДФН-оксидаза (*Rboh*) (EC 1.6.3.1)**

Одним из источников АФК у растений является НАДФН-зависимая оксидазная система, являющаяся одной из редокс-систем плазмалеммы. В геноме *A. thaliana* насчитывается десять генов (*AtRboh*, respiratory burst oxidase homolog), которые кодируют различные изоформы НАДФН-оксидазы [Sagi, Fluhr, 2006; Suzuki et al., 2011]. Активность НАДФН-оксидазы возрастает при самых различных воздействиях, в том числе и при повышении температуры [Suzuki et al., 2011], однако экспрессия генов *A. thaliana*, кодирующих этот фермент, изменяется слабо. Исключением из правил является ген *RBOHD*. Экспрессия этого гена в клетках арабидопсиса возрастает в ответ на холододовой, солевой, тепловой, окислительные стрессы, а также засуху и поранение [Suzuki et al., 2011]. В геноме риса обнаружено девять генов НАДФН-оксидазы. В отличие от *A. thaliana*, профили экспрессии генов риса значительно различались в зависимости от типа стрессового воздействия [Wang et al., 2013].

Все белки *Rboh* растений имеют одинаковую структуру: цитозольный ФАД - и НАДФН - связывающие домены и 6 трансмембранных спиралей с 2 гемами. Кроме того, в одном из цитозольных доменов располагается

кальций-связывающий мотив, мотив левой руки (EF-hand), и фосфорилирующий домен, которые имеют большое значение для функционирования НАДФН-оксидазы [Suzuki et al., 2011; Sagi, Fluhr, 2006; Глянко, Ищенко, 2010].

НАДФН-оксидазы участвуют в продукции АФК при нормальном росте и развитии растений, а также при биотическом стрессе. Кроме того, белки Rboh участвуют в регуляции ответа растительной клетки на абиотическое воздействие [Suzuki et al., 2011]. Образование АФК в результате функционирования НАДФН-оксидазы происходит при передаче электрона от цитоплазматического НАДФН на ФАД и гем. Далее электрон переносится на наружную сторону плазматической мембраны, где взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием супероксид-радикала. Затем супероксид-радикал в результате функционирования супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода [Sagi, Fluhr, 2006; Глянко, Ищенко, 2010; Suzuki et al., 2011].

Из-за наличия EF-мотива активность белков Rboh возрастает при повышении уровня цитозольного кальция [Ogasawara et al., 2008]. В свою очередь, повышение продукции АФК приводит к активации кальциевых каналов на плазматической мембране растений и еще большему поступлению кальция в цитозоль [Sagi, Fluhr, 2006]. Кроме того, НАДФН-оксидаза может активироваться в результате фосфорилирования кальций-зависимых протеинкиназ [Ogasawara et al., 2008; Suzuki et al., 2011].

Участвует ли НАДФН-оксидазы растений в образовании АФК при тепловом воздействии? Хотя известно, что активность НАДФН-оксидазы возрастает при повышении температуры [Dat et al., 2000; Колупаев и др., 2012], данные по этому поводу довольно противоречивы. Ингибитором НАДФН-оксидаз растений является дифенилениодония хлорид [Mittler et al., 2004]. Показано, что добавление этого ингибитора подавляло генерацию АФК в клетках арабидопсиса [Volkov et al., 2006] и табака [Königshofer et al., 2008] при тепловом воздействии. На этом основании было предположено,

что источником образования АФК в гетеротрофной культуре клеток при повышении температуры являются НАДФН-оксидазы растений [Königshofer et al., 2008]. Следует отметить, что дифенилениодония хлорид является ингибитором не только НАДФН-оксидазы, но и всех флавин-содержащих ферментов [Møller, 2001], поэтому, вероятно, нельзя строго утверждать, что НАДФН-оксидазы растений являются основным источником продукции АФК при тепловом воздействии. В то же время, очевидно, что НАДФН-оксидазы участвуют в передаче сигнала у растений при повышении температуры. Экспрессия отдельных генов, кодирующих изоформы НАДФН-оксидазы, возрастает при тепловом воздействии у арабидопсиса и риса [Suzuki et al., 2011; Wang et al., 2013]. А делеция генов *RBOHB* и *RBOHD A. thaliana* подавляла способность растений развивать индуцированную термотолерантность [Larkindale et al., 2005].

Недавно было продемонстрировано, что НАДФН-оксидазы арабидопсиса участвуют в передаче системного сигнала о тепловом воздействии по всему растению в системной приобретенной устойчивости [Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013; Baxter et al., 2014]. Оказалось, что делеция гена *RBOHD A. thaliana* не влияла на синтез БТШ в листе, непосредственно подвергнутом тепловому воздействию, но подавляла этот процесс в листьях растения, которые тепловому воздействию не подвергались [Miller et al., 2009]. На этом основании авторы предположили, что образование АФК в результате функционирования *RBOHD* необходимо для передачи системного сигнала по всему растению. Волна АФК, образуемая в одной части растения, может передаваться через апопласт к другим частям растения и вызывать там активацию экспрессии БТШ [Suzuki et al., 2013]. К сожалению, осталось неизвестным, как делеция гена *RBOHD* влияет на образование АФК в листьях, подвергнутых тепловому воздействию.

Таким образом, в научной литературе отсутствуют твердые доказательства об участии НАДФН-оксидазы в продукции АФК у растений

на начальных этапах теплового воздействия. Хотя, очевидно, что этот фермент играет важную роль в передаче системного сигнала.

#### 1.4.2.2. Пероксидазы (ЕС 1.11.1.7)

Пероксидазы, гемсодержащие гликопротеины, известны уже очень давно, порядка 70 лет, и на протяжении этого периода времени они активно изучаются. Пероксидазы выполняют антиоксидантные функции, защищая клетки от разрушительного действия пероксида водорода. Однако они могут работать и как оксидазы, путем окисления железа (из  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$  валентность) и передачи электронов от восстановителей (НАДН) на молекулярный кислород. Подобная активность пероксидаз приводит к образованию АФК (супероксид-радикала, пероксида водорода, гидроксил-радикала) [Минибаева, Гордон, 2003].

В растениях некоторые пероксидазы локализованы в апопластном пространстве клеток, где они связаны ионными или ковалентными связями с полимерами клеточной стенки [Минибаева, Гордон, 2003]. Эти пероксидазы получили название пероксидазы класса III. Пероксидазы класса III являются кальций-зависимыми ферментами [Колупаев и др., 2012]. Известно около 73 генов *A. thaliana*, кодирующих эти ферменты [Cosio, Dunand, 2009].

Во многих случаях бывает сложно разграничить прооксидантную и антиоксидантную функции пероксидазы [Колупаев и др., 2012]. Тем не менее, многие авторы отводят пероксидазам ключевую роль в образовании АФК у растений [Минибаева, Гордон, 2003; Колупаев, Карпец, 2009]. Предполагается, что сначала при действии стресса происходит повышение активности пероксидазы (в том числе и апопластной). На следующем этапе усиливается образование АФК, что приводит к повышению уровня кальция в цитозоле. Затем активируются НАДФН-оксидазы, и продукция АФК еще более возрастает [Колупаев, Карпец, 2009].

Показано, что активация пероксидаз может наблюдаться при самых различных стрессовых воздействиях [Минибаева, Гордон, 2003; Cosio, Dunand, 2009; Колупаев, Карпец, 2009]. Согласно работам [Минибаева,

Гордон, 2003; Cosio, Dunand, 2009], пероксидазы класса III продуцируют АФК в ответ на биотический и механический стрессы. Показано, что во внеклеточном растворе, полученном после инкубации отсеченных корней пшеницы, наблюдалось повышение содержания супероксид-радикала. Одновременно возрастала пероксидазная активность, а также повышалось количество растворимых пероксидаз с молекулярной массой 37, 40 и 136 кДа. Образование АФК подавлялось при добавлении цианида калия и азид натрия, ингибиторов пероксидаз [Minibayeva et al., 2009]. Однако вклад этих ферментов в общую продукцию АФК в клетке достаточно трудно установить. Цианид калия и азид натрия, ингибиторы пероксидаз, являются ингибиторами всех гем-содержащих ферментов. В растительной клетке функционирует множество генов пероксидаз, и инактивация одного из этих генов, как правило, никак не влияет на продукцию АФК поскольку утрата одного из генов компенсируется функционированием других гомологичных генов [Cosio, Dunand, 2009].

Роль пероксидаз класса III в образовании АФК при тепловом воздействии мало изучена. Показано, что повышение температуры вызывает в корнях пшеницы повышение содержания пероксида водорода, усиление активности пероксидазы и изменение изоферментного спектра пероксидаз. В то же время усиление генерации АФК подавлялось как ингибиторами НАДФН-оксидазы, так и ингибиторами пероксидаз [Колупаев, Карпец, 2009; Колупаев и др., 2012].

#### *1.4.2.3. Хлоропласты*

Одним из основных сайтов генерации АФК в фотосинтезирующих клетках растений являются хлоропласты. Например, обработка протопластов арабидопсиса ультрафиолетовым светом приводила к генерации АФК. Но продукция АФК подавлялась, если протопласты инкубировали в темноте [Gao et al., 2008]. Специфичные для растений органеллы – хлоропласты участвуют в сложном механизме улавливания света и преобразовании его в химическую энергию. Однако в данном процессе могут образовываться АФК

[Asada, 2006]. Образование АФК происходит при перевосстановлении электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, также при создании условий, когда поступает много световой энергии; при недостатке  $\text{CO}_2$ , НАДФ<sup>+</sup>. Фотопродукция АФК в значительной мере зависит от физиологических факторов и факторов окружающей среды. Главными центрами производства АФК в тиллакоидах хлоропластов в процессе фотосинтеза служат ФСІ и ФСІІ [Asada, 2006]. Они состоят из большого числа компонентов, которые вовлечены в процесс преобразования поглощенной энергии света в химическую [Asada, 2006].

В процессе фотосинтеза фотосистемы участвуют в генерации следующих АФК: синглетный кислород, супероксид-радикал, пероксид водорода [Asada, 2006].

Образование синглетного кислорода происходит в ФСІІ в результате контакта молекулярного кислорода (в триплетном состоянии) с хлорофиллом, который поглотил фотон и находится в триплетном возбужденном состоянии. Такая ситуация возникает при высокой интенсивности света, когда количество фотонов слишком велико и превышает уровень, необходимый для насыщения фотосинтеза [Asada, 2006].

Образование супероксид-радикала происходит в ФСІ. Супероксид-радикал образуется путем передачи электронов с железо-серных кластеров на молекулярный кислород. Восстановленный ферродоксин также может отдавать электрон на молекулярный кислород. Кроме того, генерация супероксид-радикала возможна в ФСІІ в  $Q_A$  и  $Q_B$  сайтах [Asada, 2006]. Генерация пероксид водорода происходит из супероксид-радикала, который образовался ранее в ФСІ, в реакциях, описанных в главе 1.4.1.

Абиотические и биотические факторы приводят к продукции АФК хлоропластами [Torres, 2010; Suzuki et al., 2012]. Участие хлоропластов в продукции АФК при повышении температуры непосредственно не исследовалось. Однако показано, что культура клеток *A. thaliana*, выращенная на свету, содержала хорошо развитые, функциональные

хлоропласты и была более устойчива к развитию АП-ПКГ после теплового воздействия. Причем добавление антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и восстановленный глутатион, усиливало развитие АП-ПКГ. На этом основании авторы [Doyle et al., 2010] сделали предположение, что АФК, образуемые в хлоропластах, играют важную роль в развитии ПКГ у растений.

#### 1.4.2.4. *Пероксисомы*

Другой органеллой, участвующей в продукции АФК, является пероксисома. В пероксисомах есть два сайта образования супероксид-радикала:

1. В матриксе органеллы. В реакции окисления ксантина и гипоксантина, катализируемой ксантиндегидрогеназой, происходит образование мочевой кислоты и супероксид-радикала.

2. В пероксисомальной мембране органеллы, где содержится малая электрон-транспортная цепь [del Río et al., 2006].

При стрессовом воздействии увеличивается генерация АФК пероксисомами. Так, при биотическом и абиотическом воздействиях (действие тяжелых металлов, солевой стресс) развивается окислительный стресс, в котором принимают участие пероксисомы [del Río et al., 2006].

#### 1.4.2.5. *Митохондрии*

Митохондрия рассматривается как один из основных источников образования АФК в клетках животных [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Murphy, 2009] и дрожжей [Rigoulet et al., 2011]. В гетеротрофных тканях растений митохондрии также вносят значительный вклад в образование АФК [Møller, 2001]. Образование АФК митохондриями наблюдается в процессе обычного функционирования окислительного фосфорилирования, однако скорость образования митохондриальных АФК значительно усиливается в стрессовых или патологических условиях [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006]. Тепловое воздействие приводит к усилению продукции АФК в клетках растений и дрожжей, митохондрии активно участвуют в этом процессе [Qi et

al., 2011; Zhang et al., 2009; Schwärzlander et al., 2012]. Однако детали этого процесса остаются во многом неизвестными.

Большая часть АФК в митохондриях образуется в результате переноса электронов по дыхательной цепи [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Murphy, 2009; Marchi et al., 2012]. Образование АФК в митохондриях клеток животных может происходить также в результате функционирования цитохром  $b_5$  редуктазы, моноаминоксидазы, дигидрооротатдегидрогеназы, глицерин-3-фосфатдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, аконитазы и пируватдегидрогеназы [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012]. В то же время продукция АФК этими ферментными системами прямо или косвенно зависит от функционирования дыхательной цепи.

1) Цитохром  $b_5$  редуктаза расположена во внешней митохондриальной мембране. Этот фермент окисляет цитоплазматический НАД(Ф)Н и восстанавливает цитохром  $b_5$  на внешней мембране. Механизм образования АФК этим ферментом не известен [Андреев и др., 2005, Marchi et al., 2012].

2) Моноаминоксидаза (ЕС 1.4.3.4 МАО-А и МАО-В) также находится на внешней мембране. Этот фермент катализирует окисление аминов, что сопровождается образованием пероксида водорода [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012].

3) Дигидрооротатдегидрогеназа (ДНОН, ЕС1.3.3.1 или ЕС 1.3.99.11) локализована на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны. Катализирует превращение дигидрооротата в пиримидиновое основание – оротат. Данная реакция является этапом синтеза *de novo* уридин монофосфата. В отсутствие своего акцептора электронов – убихинона, восстановленная ДНОН может образовывать пероксид водорода *in vitro* [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012].

4) Глицерин-3-фосфатдегидрогеназа (mGPDH, ЕС1.1.99.5) локализована на наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны. Она является ФАД-содержащим ферментом, катализирует окисление глицерин-3-фосфата до дигидроксиацетона и использует

убихинон, как акцептор электронов. В результате этого процесса может образовываться пероксид водорода. Фермент участвует в метаболизме липидов и глицерин-фосфатном шатле, который регенерирует цитозольный НАД<sup>+</sup> из полученного в результате гликолиза НАДН [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012].

5)  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа (KGDHC или  $\alpha$ -оксоглутаратдегидрогеназа) представляет собой интегральный белок, тесно связанный с внутренней митохондриальной мембраной со стороны матрикса. Катализирует реакцию превращения  $\alpha$ -кетоглутарата до сукцинил-КоА в цикле трикарбоновых кислот, используя НАД<sup>+</sup>, как акцептор электронов. Состоит из 3 ферментов:  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы (E1 субъединица), дигидролипоамид сукцинилтрансферазы (E2 субъединица) и липоамиддегидрогеназы (E3 субъединица). Вероятным источником АФК является фермент E3, флавин-содержащий фермент, который способен генерировать супероксид-радикал и пероксид водорода [Marchi et al., 2012]. Производство АФК  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой усиливается при повышении соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup> [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Андреев и др., 2005].

6) Аконитаза (EC 4.2.1.3) находится в митохондриальном матриксе, катализирует превращение цитрата в изоцитрат в ходе цикла трикарбоновых кислот. Этот фермент инактивируется при окислении железо-сернистых центров супероксид-радикалом, что приводит к образованию гидроксил-радикала [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012].

7) Пируватдегидрогеназный комплекс локализован в митохондриальном матриксе, содержит флавопротеин дигидролипоилдегидрогеназную субъединицу, которая является важным источником АФК [Marchi et al., 2012].

### **1.5. Образование АФК компонентами дыхательной цепи**

Образование АФК дыхательной цепью митохондрий тесно связано с основной функцией этих органелл, с производством АТФ при окислительном

фосфорилировании. Окислительное фосфорилирование начинается с окисления метаболитов в цикле трикарбоновых кислот, что приводит к образованию НАДН и ФАДН<sub>2</sub>. Эти восстановленные эквиваленты являются источником электронов для дыхательной цепи, которая состоит из четырех ферментных комплексов (комплексы I, II, III, IV), а также убихинона, цитохрома *c* и F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ-синтазы, которую называют комплекс V [Millar et al., 2011]. Движущей силой транспорта электронов по дыхательной цепи является разница редокс-потенциала ее компонентов. В процессе транспорта электронов на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны выбрасываются протоны в трех пунктах сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования (комплексы I, III, IV). Снижение редокс-потенциала во время транспорта электронов образует протон-движущую силу или Δр, выражаемую в милливольтгах, которая индуцирует синтез АТФ с помощью F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ-синтазы. Протон-движущая сила имеет два компонента: митохондриальный мембранный потенциал (Δψ) и рН градиент по обе стороны мембраны (ΔрН). Однако в большинстве случаев значение протон-движущей силы определяется Δψ. Этот потенциал находится в пределах 150–180 мВ (отрицательный внутри), определяет практически все митохондриальные функции и является ключевым параметром, определяющим функциональность митохондрий [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006].

В окислительно-восстановительных реакциях электроны переносятся по дыхательной цепи на молекулярный кислород через комплекс IV. В результате последовательного переноса четырех электронов образуется две молекулы воды. Однако часть кислорода в митохондриях восстанавливается только частично, а одноэлектронное восстановление приводит к образованию супероксид-радикала. Супероксид-радикал плохо проникает через клеточные мембраны. Однако в митохондриальном матриксе супероксид-радикал трансформируется Mn<sup>2+</sup> супероксиддисмутазой до пероксида водорода,

который легко проникает через мембраны [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Marchi et al., 2012].

Где образуются АФК? Исследования с использованием изолированных митохондрий позволили установить несколько сайтов образования супероксидного-радикала. Теоретически одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксид-радикала может происходить на всех компонентах дыхательной цепи. Однако исследования с использованием изолированных митохондрий позволили показать, что образование супероксид-радикала происходит, главным образом, в комплексе I и комплексе III [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006].

### ***1.5.1. Комплекс I***

Комплекс I (НАДН-дегидрогеназа или НАДН: убихинон-оксидоредуктаза; ЕС 1.6.5.3), катализирует окисление матричного НАДН, восстанавливая убихинон (Q) до убихинола (QH<sub>2</sub>). При этом переносятся два электрона, а на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны переносятся четыре протона, что приводит к генерации  $\Delta\psi$  [Андреев и др., 2005]. Реакция полностью обратима, если убихинон восстановлен какой-либо другой дегидрогеназой дыхательной цепи, например сукцинатдегидрогеназой, в условиях высокого митохондриального потенциала [Гривенникова, Виноградов, 2013]. У растений комплекс I состоит из 49 субъединиц [Millar et al., 2011]. В митохондриях дрожжей данный комплекс отсутствует [Traba et al., 2009].

Комплекс I считается одним из основных источников генерации супероксид-радикала при функционировании дыхательной цепи, однако данные, доказывающие это положение, получены исключительно с помощью изолированных митохондрий [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012]. В качестве источника электронов для комплекса I в изолированных митохондриях используются НАД-зависимые субстраты, такие как пируват и глутамат/малат, а сукцинат, ФАД-зависимый субстрат, используется в качестве поставщика электронов для комплекса II. Описаны три механизма

образования супероксид-радикала в комплексе I изолированных митохондрий [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Гривенникова, Виноградов, 2013]. Во-первых, при использовании в качестве НАД-зависимых субстратов (пирувата или глутамат/малата) скорость образования супероксид-радикала в комплексе I довольно низкая, но генерация АФК значительно усиливается при высоком митохондриальном потенциале. Во-вторых, образование АФК возрастает при использовании ротенона, ингибитора комплекса I. В-третьих, образование АФК в комплексе I может происходить при использовании в качестве субстрата сукцината. В этом случае электроны попадают в дыхательную цепь через комплекс II. Большинство электронов переносятся по дыхательной цепи к комплексу III и IV, однако часть электронов в результате обратного транспорта электронов возвращается на комплекс I, что сопровождается усилением генерации супероксид-радикала. При этом добавление ротенона, наоборот, подавляет образование супероксид-радикала. Во всех трех случаях возрастает соотношение НАДН/НАД<sup>+</sup>. Поэтому продукция АФК в комплексе I зависит от уровня восстановленного НАДН. Следует отметить, что повышение соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup> в результате инактивации комплекса I приведет к перевосстановлению большинства НАД<sup>+</sup>-зависимых матричных ферментов, например, дигидролипоилдегидрогеназы, являющейся компонентом  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. Этот фермент, в свою очередь, также является источником образования АФК при повышении соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup> [Андреев и др., 2005; Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006].

Где именно в комплексе I наблюдается генерация АФК точно не известно. Поскольку генерация АФК в результате обратного транспорта электронов подавляется ротеноном, и, наоборот, ротенон стимулирует образование супероксид-радикала при использовании НАД-зависимых субстратов, предполагается, что супероксид-радикал может образовываться в железо-сернистых центрах N1a и N2 и в флавине [Андреев и др., 2005; Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006]. Повышение соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup> будет

приводить к перевосстановлению этих компонентов и, соответственно, усиливать вероятность образования супероксид-радикала.

Данные, полученные на изолированных митохондриях, указывающие, что комплекс I является основным источником генерации АФК, не подтверждаются в экспериментах *in situ* с использованием целых клеток. Поэтому нельзя утверждать, что комплекс I является источником АФК в интактных митохондриях *in vivo* [Marchi et al., 2012]. Изучение эффекта ротенона, индуктора АФК в изолированных митохондриях [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Murphy, 2009], показало, что этот агент усиливает продукцию АФК в клетках животных [Sipos et al., 2003], но этого не происходит в культуре клеток *A. thaliana* [Garmier et al., 2008]. Более того, оказалось, что ингибирование комплекса I ротеноном, а также инактивация комплекса в результате мутации в гене *FRO*, кодирующей Fe-S-содержащую субъединицу комплекса I, подавляет продукцию АФК [Тарасенко и др., 2010]. В изолированных митохондриях ротенон подавляет образование супероксид-радикала в результате обратного транспорта электронов, если использовать в качестве субстрата сукцинат [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006]. Нельзя исключить, что способность ротенона подавлять продукцию АФК в целых растениях арабидопсиса [Тарасенко и др., 2010] объясняется теми же самыми причинами. Однако это маловероятно, поскольку в обычных условиях основным источником восстановленных эквивалентов в клетке является НАДН [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006].

Почему же результаты, полученные на изолированных митохондриях, не подтверждаются в экспериментах *in situ*? Согласно работе [Garmier et al., 2008], обработка ротеноном культуры клеток *A. thaliana* приводила к активации гликолиза. Это указывает, что в целых клетках растений обработка ротеноном может не приводить к повышению соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup>, решающего фактора для генерации АФК комплексом I [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006], в результате активации гликолиза. Таким образом, есть основания считать, что в целых клетках растений, в отличие от

изолированных митохондрий, комплекс I не принимает участия в генерации АФК.

### **1.5.2. Комплекс II**

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа, сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза, SDH EC 1.3.5.) находится на внутренней митохондриальной мембране и состоит из четырех субъединиц: флавопротеина SDH1, железо-сернистой субъединицы SDH2 и двух субъединиц, закоренных в мембране (SDH3 и SDH4) [Millar et al., 2011]. Комплекс II окисляет ФАД-зависимые субстраты, такие как сукцинат, передает электроны в дыхательную цепь, восстанавливая убихинон. Хотя окисление сукцината в комплексе II может теоретически являться источником АФК, на изолированных митохондриях это не продемонстрировано [Андреев и др., 2005; Marchi et al., 2012]. В то же время окисление сукцината является важным источником АФК при исследовании изолированных митохондрий в результате обратного транспорта электронов (см. выше).

Непосредственное доказательство участия комплекса II в образовании АФК было продемонстрировано на растениях арабидопсиса [Gleason et al., 2011]. Было показано, что в клетках дикого типа обработка салициловой кислотой приводила к активации экспрессии гена *GSTF8*, кодирующего глутатион-S-трансферазу, но у мутанта по гену *SDH1* такого эффекта не наблюдалось. Дальнейшие исследования показали, что в клетках мутанта подавляется продукция АФК в ответ на действие салициловой кислоты. Полученные данные указывают, что комплекс II является одним из источников АФК в растительной клетке, а также на то, что повышение содержания АФК при действии стрессовых факторов является неперенным условием для активации некоторых стрессовых генов [Gleason et al., 2011].

### **1.5.3. Комплекс III**

Комплекс III (bc<sub>1</sub> комплекс, убихинон-цитохром c оксидоредуктаза) представляет собой ферментный комплекс, который у растений состоит из

десяти субъединиц [Millar et al., 2011]. Комплекс III окисляет убихинол, используя в качестве акцептора электронов цитохром *c*.

Окислению убихинола предшествует ряд реакций, известных как Q-цикл, которые сопряжены с транспортом протонов на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны и генерацией митохондриального потенциала [Андреев и др., 2005]. У прокариот эту реакцию катализирует цитохром *b*, цитохром *c<sub>1</sub>* и железо-серный белок Риске. Комплекс III эукариот дополнительно содержит до 8 субъединиц, выполняющих, по-видимому, структурную роль. В мембране фермент функционирует в виде димера. Каждый мономер состоит из гидрофобного полипептида, в структуру которого входят два цитохрома *b*: низкопотенциальный (*b<sub>L</sub>*) и высокопотенциальный (*b<sub>H</sub>*), которые располагаются вблизи наружной и внутренней поверхностей мембраны, соответственно. Цитохром *c<sub>1</sub>* и железо-серный кластер [2Fe-2S] (белок Риске) закреплены с помощью трансмембранных спиралей, а периферические домены этих белков локализованы в межмембранном пространстве. Белок Риске обеспечивает перекрестную связь между мономерами. Его трансмембранная часть связана с одним мономером, а периферическая часть – с другим [Гривенникова, Виноградов, 2013].

На первой стадии Q-цикла убихинол (UQH<sub>2</sub>) отдает один электрон в центре Q<sub>o</sub> (out), который находится на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны и окисляется до убисемихинона (UQ<sup>•+</sup>). Этот электрон восстанавливает железо-серный кластер белка Риске и далее переносится на цитохромы *c<sub>1</sub>* и *c*. Затем убисемихинон (UQ<sup>•+</sup>) отдает второй электрон и превращается в убихинон (UQ). Второй электрон восстанавливает цитохром *b<sub>L</sub>* и далее переносится на цитохром *b<sub>H</sub>*, расположенный на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны вблизи второго убихинон-связывающего центра Q<sub>i</sub> (in). Здесь цитохром *b<sub>H</sub>* передает электрон уже другой молекуле убихинона (UQ) с образованием убисемихинона (UQ<sup>•+</sup>). Далее убисемихинон (UQ<sup>•+</sup>), находящийся в сайте Q<sub>i</sub>,

принимает второй электрон от другого убисемихинона ( $UQ^{\bullet-}$ ), находящегося в сайте  $Q_o$ , и восстанавливается до убихинола ( $UQH_2$ ). Результатом этого цикла является то, что убисемихинон образуется как на сайте  $Q_i$ , так и на сайте  $Q_o$ . Убисемихинон является крайне нестабильным соединением, поэтому он легко взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием супероксид-радикала. Таким образом, супероксид-радикал может образовываться на обеих сторонах внутренней митохондриальной мембраны. Поскольку сайт  $Q_o$  более доступен для кислорода, он является более значительным источником супероксид-радикала. Однако существуют доказательства, что супероксид-радикал может образовываться в сайте  $Q_i$ . Эффект митохондриальных ингибиторов доказывает, что убисемихинон ( $UQ^{\bullet-}$ ) является источником супероксид-радикала. Миксотиазол ингибирует передачу электрона к железо-серному белку Риске, и, соответственно, подавляет образование убисемихинона в сайте  $Q_i$ . Одновременно миксотиазол подавляет образование супероксид-радикала в комплексе III. Антимидин А, который ингибирует транспорт электрона от сайта  $Q_o$  к сайту  $Q_i$ , наоборот, приводит к накоплению убисемихинона в сайте  $Q_o$ . При этом наблюдается усиление образования супероксид-радикала [Kowaltowski et al., 2009].

Хотя механизм образования АФК в комплексе III с использованием изолированных митохондрий достаточно хорошо изучен, некоторые авторы выражают сомнения, имеет ли это какое-либо физиологическое значение. Согласно [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006] усиление продукции АФК в комплексе III наблюдается только в искусственных условиях, при его ингибировании антимидином А. Сходного мнения придерживаются другие авторы [Зоров и др., 2007], считая, что нет доказательств, что комплекс III генерирует АФК в клетках млекопитающих *in situ*. Действительно, утрата цитохрома *c*, которая теоретически должна приводить к восстановлению комплекса III и усилению продукции АФК в клетках млекопитающих, на самом деле к этому не приводит [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006].

Аналогичные противоречивые результаты получены и для клеток растений и дрожжей. С одной стороны, показано, что обработка антимицином А повышала продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* [Rasmussen et al., 2003]. С другой стороны, инкубация клеток дрожжей в среде с высокой концентрацией глюкозы усиливала генерацию АФК, но антимицин А в этих условиях не повышал, а, наоборот, понижал содержание АФК [Lee et al., 2011]. Нарушение функционирования убихинона теоретически должно снижать продукцию АФК в комплексе III. Но в действительности оказалось, что делеция гена *CAT5 S. cerevisiae*, который кодирует убихинон, не снижала образование АФК при тепловом воздействии, а, наоборот, увеличивала [Davidson, Schiestl, 2001]. Эффект антимицина А на клетки растений также достаточно противоречив. Одни авторы показали, что антимицин А усиливает генерацию АФК в растениях *A. thaliana* [Тарасенко и др., 2010; Umbach et al., 2012], другие получили прямо противоположные результаты [Schwarzländer et al., 2009]. Таким образом, имеющиеся в литературе данные не позволяют однозначно утверждать, что комплекс III принимает участие в образовании митохондриальных АФК в клетках дрожжей и растений.

#### **1.5.4. Комплекс IV**

Данный комплекс (цитохром *c* оксидаза) является терминальной оксидазой классической ЭТЦ митохондрий. У растений комплекс IV содержит 14 белков [Millar et al., 2011], шесть из которых специфичны только для растений. У дрожжей обнаружено порядка 40 факторов, обеспечивающих различные этапы сборки данного комплекса, их гомолог – COX19 найден и изучен у растений. COX19 играет важную роль в замене поврежденной растительной цитохром *c* оксидазы [Millar et al., 2011]. В работе [Тарасенко и др., 2010] показано, что при ингибировании комплекса IV цианидом происходит образование АФК в клетках растений.

#### **1.5.5. Альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы**

В клетках растений и дрожжей функционируют альтернативные способы поступления восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь,

которые минуя комплекс I. Внешние или цитозольные НАДН и НАДФН могут окисляться двумя НАД(Ф)Н-дегидрогеназами (НАД(Ф)Н:убихинон оксиредуктазами), расположенными на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны. На внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны внутренние НАД(Ф)Н-дегидрогеназы окисляют внутримитохондриальный пул НАДН и НАДФН. Функционирование этих ферментов не приводит к транспорту протонов в комплексе I, и они не ингибируются ротеноном, поэтому они называются ротеноном-нечувствительными или альтернативными НАД(Ф)Н-дегидрогеназами типа II. В клетках *A. thaliana* функционирует семь НАД(Ф)Н-дегидрогеназ типа II. Белки NDB1-NDB4 являются внешними, обращены на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны. Белки NDA1, NDA2 и NDC1 обращены на внутреннюю сторону митохондриальной мембраны [Millar et al., 2011].

Принято считать, что внешние и внутренние НАД(Ф)Н-дегидрогеназы растений выполняют антиоксидантную роль, поскольку поступление НАДН и НАДФН в дыхательную цепь в обход комплекса I, вероятного источника генерации АФК, теоретически должно снижать образование АФК в митохондриях [Møller, 2001; Amirsadeghi et al., 2007]. Тем не менее, не исключается, что они могут участвовать в продукции АФК [Amirsadeghi et al., 2007]. Показано, что делеция гена *NDB4*, кодирующего флавин-содержащий фермент – митохондриальную альтернативную НАД(Ф)Н-дегидрогеназу, подавляет продукцию АФК в клетках арабидопсиса [Smith et al., 2011].

Участие внешних и внутренних НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в продукции АФК показано и для дрожжей. Так, делеция генов *NDE1* и *NDE2* приводила к снижению генерации АФК и повышала выживаемость клеток дрожжей при тепловом воздействии [Davidson, Schiestl, 2001]. Показано, что генерация АФК в клетках *S. cerevisiae* в отсутствие стресса значительно усиливается при суперэкспрессии гена *NDII*, кодирующего внутреннюю НАДН-

дегидрогеназу, и, наоборот, делеция этого гена подавляла продукцию АФК [Li et al., 2006]. С помощью изолированных митохондрий *S. cerevisiae* показано, что внешние НАДН-дегидрогеназы являются основными источниками образования АФК при использовании НАДН в качестве субстрата [Fang, Beattie, 2003; Gomes et al., 2013]. Согласно работе [Davidson, Schiestl, 2001], вероятной причиной образования АФК в клетках дрожжей является перевосстановление флавинадениндинуклеотида, кофактора внешних НАДН-дегидрогеназ.

### **1.6. Продукция АФК и митохондриальный мембранный потенциал**

Изложенные выше литературные данные, указывают, что повышение генерации АФК в изолированных митохондриях происходит, как правило, при ингибировании ротеином комплекса I, а также при ингибировании антимицином А комплекса III [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Гривенникова, Виноградов, 2013]. Это обстоятельство дало основание ряду авторов [Gourlay et al., 2004; Zhang et al., 2007; Navrot et al., 2007] полагать, что в целых клетках растений и дрожжей нарушение функционирования комплексов I и III приводит к перевосстановлению компонентов этих комплексов, что и является причиной генерации АФК при действии биотических и абиотических стрессов. Обработка ротеином и антимицином А, стимулируя митохондриальную генерацию АФК, вызывает снижение митохондриального потенциала (МП) [Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Suski et al., 2012]. Следовательно, если это положение верно, то продукция АФК у растений и дрожжей должна усиливаться при снижении МП. Действительно, есть результаты, указывающие, что снижение МП может приводить к генерации АФК в клетках дрожжей. Показано, что делеция генов *ATG1*, *ATG6*, *ATG8* и *ATG12*, чьи продукты регулируют процесс аутофагии в клетках дрожжей, приводила к снижению уровня дыхания, подавляла МП, и при этом наблюдалось повышение генерации АФК [Zhang et al., 2007]. Нарушение функционирования актина снижало МП и усиливало продукцию АФК

[Gourlay et al., 2004]. Аналогичным образом обработка протопластов арабидопсиса ультрафиолетом, протопорфирином, церамидом и экспрессия *avrRpt2*, элиситора реакции сверхчувствительности, приводили к снижению МП и усилению продукции АФК [Yao et al., 2004; Gao et al., 2008].

Обработка ультрафиолетом, протопорфирином, церамидом, а также экспрессия *avrRpt2*, кроме генерации АФК, приводили также к развитию ПКГ в клетках растений [Yao et al., 2004; Gao et al., 2008]. Одним из этапов развития ПКГ является выход цитохрома *c* из митохондрий. Показано, что тепловое воздействие индуцирует выход цитохрома *c* из митохондрий табака [Vacca et al., 2006] и арабидопсиса [Rikhvanov et al., 2007]. Считается, что выход цитохрома *c* из митохондрий приводит к нарушению функционирования дыхательной цепи и повышению генерации АФК [Reare, McCabe, 2008; De Pinto et al., 2012]. Причиной выхода цитохрома *c* является открытие митохондриальной поры, что приводит к снижению МП [Vianello et al., 2007]. Действительно, добавление циклоспорина, ингибитора митохондриальной поры, подавляло снижение МП и защищало протопласты табака от гибели при воздействии ультрафиолета [Gao et al., 2008]. Таким образом, принято считать, что развитие ПКГ зависит от снижения МП, выхода цитохрома *c* и усиления продукции АФК [Vianello et al., 2007; Reare, McCabe, 2008; De Pinto et al., 2012].

В то же время зависимость между МП и продукцией АФК не является однозначной. С использованием изолированных митохондрий показано, что в некоторых случаях продукция АФК усиливается при повышении МП. В изолированных митохондриях в состоянии 3, в присутствии субстрата дыхания транспорт электронов по дыхательной цепи сопряжен с выбросом протонов на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны. В результате на внешней стороне генерируется избыточно положительный заряд. В присутствии АДФ протоны возвращаются в матрикс через сектор  $F_0$  комплекса  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы, что приводит к снижению мембранного потенциала и синтезу АТФ. При истощении АДФ синтез АТФ ингибируется,

и митохондрии переходят в состояние 4. В этом случае, возвращение протонов в матрикс не происходит, что приводит к повышению МП и усилению продукции АФК. Снижение МП в результате действия протонифоров в изолированных митохондриях ингибирует генерацию АФК [Korshunov et al., 1997; Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000]. Это дало основание сделать вывод, что высокое значение МП в метаболическом состоянии 4 стимулирует образование АФК в митохондриях [Skulachev, 1998]. Данное положение получило подтверждение при использовании целых клеток дрожжей. Значительное повышение МП в клетках *S. cerevisiae* наблюдалось при экспрессии про-апоптозного белка человека BAX [Gross et al., 2000], обработке амиодароном [Pozniakovsky et al., 2005], изопреноидом фарнезолом [Machida, Tanaka, 1999], уксусной кислотой [Ludovico et al., 2002], кадмием [Nargund et al., 2008]. Во всех описанных случаях повышение МП сопровождалось усилением продукции АФК. Аналогичная зависимость в ряде случаев выполняется и для растений. Добавление кампотецина к протопластам сахарной свеклы вызывало повышение генерации АФК, что сопровождалось повышением МП [Weir et al., 2003]. При взаимодействии фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* с культурой клеток петрушки наблюдалось увеличение продукции АФК и повышение потенциала на внутренней митохондриальной мембране [Naton et al., 1996]. Обработка протопластов корня арабидопсиса приводила к усилению митохондриальной продукции АФК. Одновременно наблюдалось усиление флуоресценции CMXRos (митотрекер красный), что указывает на повышение потенциала [Yao, Greenberg, 2006]. Обработка внеклеточной АТФ культуры клеток тополя вызывала повышение МП и усиление продукции АФК. Подавление МП в результате действия CCCP снижало продукцию АФК [Sun et al., 2012].

Анализ вышеприведенных литературных данных указывает, что в одних случаях повышение МП сопровождается усилением продукции АФК, в других случаях, наоборот, генерация АФК может происходить при понижении МП. Что же происходит при тепловом воздействии в клетках

дрожжей и растений? Данные по этому поводу также крайне противоречивые. Показано, что тепловое воздействие приводило к снижению МП в протопластах арабидопсиса и риса [Zhang et al., 2009; Qi et al., 2011], что сопровождалось усилением продукции АФК. С другой стороны, показано, что мягкое тепловое воздействие, вызывающее активацию экспрессии генов БТШ, приводило к повышению МП в клетках млекопитающих [Balogh et al., 2005], дрожжей [Федосеева и др., 2012] и арабидопсиса [Пятрикас и др., 2014]. К сожалению, в последних случаях продукцию АФК при тепловом воздействии не анализировали.

### **1.7. Выводы из обзора литературы**

Повышение температуры, а также другие стрессовые воздействия индуцируют в клетках растений и животных синтез белков теплового шока (БТШ), которые защищают клетку от гибели. Механизм восприятия и трансдукции сигнала, приводящего к активации экспрессии БТШ у растений, остается во многом неизвестным. Существуют результаты, указывающие, что продукция АФК играет ключевую роль в этом процессе.

Тепловое воздействие вызывает в клетках растений усиление генерации АФК, и есть основания полагать, что в гетеротрофных тканях растений митохондрии участвуют в образовании АФК. С использованием изолированных митохондрий показано, что усиление генерации АФК может наблюдаться как при снижении митохондриального мембранного потенциала, так и при его повышении.

Механизм митохондриальной генерации АФК клетками растений и дрожжей при стрессовом воздействии *in situ* слабо изучен. В литературе существуют противоречивые данные о связи между повышением МП и усилением продукции АФК при тепловом воздействии. Таким образом, представляет интерес выяснить, как повышение МП повлияет на продукцию АФК при тепловом воздействии в клетках растений и дрожжей.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования и условия культивирования

В работе использовали гетеротрофные суспензионные культуры клеток растений: суспензионную культуру озимой пшеницы, полученную в СИФИБР СО РАН из зрелых зародышей озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорта Иркутская), и сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L., сорта РОJ2878, линия, устойчивая к аноксии), полученную в ИФР РАН и любезно предоставленную к.б.н. лаборатории генетической инженерии СИФИБР СО РАН В.Н. Шмаковым.

Культуры выращивали в темноте при 26 °С в термостатируемой комнате на качалке на среде Мурасиге-Скуга [Murashige, Scoog, 1962], содержащей 3,6%-ную сахарозу, 0,6 мг/л никотиновой кислоты, 0,6 мг/л пиридоксина, 1,2 мг/л тиамина, 3 мг/л 2,4-Д, 120 мг/л инозитола, 6 мг/л дитиокарбамата натрия. Культуры растительных клеток пересаживали каждые 14 дней с разведением культуры озимой пшеницы свежей средой в 3 раза, а культуры клеток сахарного тростника в 6 раз. Для экспериментов использовали клетки суспензионных культур в экспоненциальной фазе роста на 7-е сутки после пересадки.

В работе также использовали штамм родительского типа *Saccharomyces cerevisiae* W303-1В (*MATa ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1 [rho<sup>+</sup>]*), любезно предоставленный Л. Sabova (Институт исследования рака, Словакия), и изогенный ему мутант *petite* (мутант по дыхательной недостаточности), полученный в СИФИБР СО РАН к.б.н. И.В. Федосеевой.

Штамм W303-1В содержит мутацию *ade2*, которая вызывает ауксотрофность по аденину и накопление красного пигмента. Мутанты *petite* образуют мелкие белые колонии. Для получения мутантов *petite* клетки родительского типа инкубировали в среде YEPD в присутствии 20 мкг/мл бромистого этидия, индуктора мутации *petite*. После 16 ч инкубации при 30 °С суспензию клеток высевали на твердую среду YEPD. Мутанты *petite* отбирали по белой окраске колоний. Фенотип мутантов подтверждали по

отсутствию: а) роста на среде с этанолом; б) поглощения кислорода; в) окрашивания мтДНК красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, США) [Федосеева и др., 2014].

Дрожжи выращивали на среде YEPD (дрожжевой экстракт – 5 г/л; пептон – 10 г/л; глюкоза – 20 г/л) в течение 14–16 ч при 30 °С на термостатируемой качалке в колбах емкостью 100 мл с 25 мл жидкой среды. Затем определенный объем «ночной культуры» вносили в свежую питательную среду, и дрожжи инкубировали до достижения логарифмической фазы роста. Для приготовления твердых сред добавляли агар (15 г/л).

## **2.2. Температурное воздействие**

Для определения содержания белков теплового шока культуры клеток озимой пшеницы и сахарного тростника подвергали воздействию различных положительных температур: 37 °С – 120 мин, 39 °С – 120 мин, 43 °С – 60 мин, 46 °С – 40 мин, 50 °С – 10 мин, используя водяной термощейкер («Eran 357», Польша).

Для определения изменения процессов, происходящих в клетках, при тепловых воздействиях, таких как жизнеспособность клеток, продукция АФК, изменение электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий, изменения внутриклеточного кальциевого гомеостаза контрольные культуры клеток растений и дрожжей объемом 100 мкл подвергались воздействию различными повышенными температурами: 37, 42, 45, 50, 55, 60 °С в течение 0–90 мин при инкубации на минитермощейкере TS-100 («BioSan», Латвия). В качестве контроля использовали клетки, инкубируемые при 26 °С (растения) и 30 °С (дрожжи).

В работе была использована обработка низкими отрицательными температурами культуры клеток озимой пшеницы (–8 °С в течение 1 ч) и сахарного тростника (–8 °С в течение 2 ч) в экспериментах для определения изменений уровня АФК и потенциала на внутренней мембране митохондрий.

Температурную обработку проводили в инкубаторах MIR-153 и MIR-154 («SANYO», Япония).

### **2.3. Концентрации используемых агентов**

Для изучения эффекта химических агентов на содержание АФК, изменение электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий, жизнеспособность клеток и внутриклеточного кальциевого гомеостаза использовали следующие агенты в конечных концентрациях: СССР (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон) («Sigma», США) 0,04; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 4; 2; 8 и 20 мкМ; олигомицин 30, 50 мкМ; ДНФ (2,4-динитрофенол) («Химреактивснаб», Россия) 0,1; 0,5; 1 мМ; ЭГТА ((этилендиокси)диэтилендинитрилтетрауксусная кислота) («Sigma», США) 5, 7, 10 мМ; LaCl<sub>3</sub> («Sigma», США) 5, 10, 15 мМ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> («Центрснаб-М», Россия) 50 мкМ; аскорбиновая кислота («Sigma», США) 10, 100 мМ.

### **2.4. Флуоресцентная микроскопия**

При изучении влияния температурных воздействий на жизнеспособность клеток, продукцию АФК, изменение электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий, изменение кальциевого гомеостаза использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп AxioObserver Z1 («Carl Zeiss», Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения для анализа изображений «AxioVision Rel.4.6». В работе были использованы следующие фильтры: Filter set 15 (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590), Filter set 10 (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 565) и Filter set 20 (EX BP 546/12, BS FT 560, EM BP 575-640).

Использование моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 позволяет оценить изменение интенсивности флуоресценции красителей. Использование данного прибора совместно с программным модулем AxioVision Rel.4.6 позволяет делать фотографии с одинаковыми параметрами микроскопа и, таким образом, позволяет определить различие интенсивности флуоресценции красителей в образцах

посредством измерения интенсивности характерных пикселей на оцениваемых фотографиях с помощью программного инструмента. Интенсивность флуоресценции красителей оценивали не менее чем в 300 клетках и выражали в процентах от контроля или относительных единицах.

## **2.5. Определение жизнеспособности**

Жизнеспособность у клеток культур растений после теплового воздействия определяли методом двойного окрашивания флуоресцентными красителями, а у дрожжей по подсчету количества колониеобразующих единиц (КОЕ).

### ***2.5.1. Определение жизнеспособности с использованием метода двойного окрашивания флуоресцентными красителями***

Жизнеспособность клеток культур озимой пшеницы и сахарного тростника после теплового воздействия оценивали методом двойного окрашивания в течение двух минут с использованием флуоресцентных красителей: флуоресцеин диацетата (fluorescein diacetate, FDA) в конечной концентрации 50 мкМ («Sigma», Германия) и пропидий йодида (propidium iodide, PI) в конечной концентрации 7,5 мкМ («Biotium», США).

Для этого 100 мкл суспензии клеток контрольной культуры и культуры сразу после температурного воздействия инкубировали с вышеуказанными красителями в течение 2 мин при 26 °С.

FDA является витальным (прижизненным) красителем и исходно представляет собой нефлуоресцирующее соединение. FDA проникает через клеточные мембраны живой клетки, где за счет активности эндогенных эстераз, отщепляющих диацетатный остаток, превращается во флуоресцеин, после чего приобретает способность к флуоресценции в зеленом канале, которую оценивали с использованием Filter set 10 (EX BP 450–490, BS FT 510, EM BP 565). В мертвых клетках отсутствует эстеразная активность, поэтому окрашивания не происходит [Yamori et al., 2005].

PI проникает в мертвые и погибающие клетки, у которых нарушена проницаемость плазматической мембраны, соединяется с ДНК и образует

связи между основаниями (одна молекула красителя на 4–5 пар оснований). При этом способность PI флуоресцировать в красном канале, с использованием Filter set 15 (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590) увеличивается в несколько раз. Краситель также может взаимодействовать с молекулами РНК.

Для количественного подсчета живых (окрашенных FDA в зеленый цвет) и мертвых (окрашенных PI в красный цвет или неокрашенных) клеток в каждом эксперименте оценивали 10 случайных полей зрения, полученных с использованием флуоресцентного микроскопа.

### **2.5.2. Определение жизнеспособности по подсчету колониеобразующих единиц**

Для подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) суспензию клеток дрожжей *S. cerevisiae* после серии десятикратных разведений высевали на твердую среду YEPD. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) регистрировали, спустя 24–48 ч инкубации при 30 °С. Выживаемость определяли как процент образовавшихся КОЕ после определенного периода теплового воздействия к количеству КОЕ до воздействия.

### **2.6. Определение содержания АФК**

Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate – H<sub>2</sub>DCF•DA («Fluka», Швеция). Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. H<sub>2</sub>DCF•DA при деацетилировании эстеразами превращается в H<sub>2</sub>DCF. В присутствии АФК H<sub>2</sub>DCF окисляется до DCF, который в дальнейшем флуоресцирует в зеленом канале. Для регистрации сигнала использовали Filter set 10 (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 565) [Suski et al., 2012]. Для определения уровня АФК клетки растений инкубировали с 1 мкМ H<sub>2</sub>DCF•DA в течение 10 мин, а клетки дрожжей – с 50 мкМ в течение 30 мин.

Для проверки специфичности действия красителя оценивали изменение его флуоресценции в ответ на добавление  $H_2O_2$  (50 мкМ; отрицательный контроль) и аскорбиновой кислоты (10, 100 мМ; положительный контроль). Интенсивность флуоресценции красителя  $H_2DCF\cdot DA$  в зеленом канале оценивали не менее чем в 300 клетках и выражали в процентах от контроля или относительных единицах.

## **2.7. Определение электрохимического митохондриального мембранного потенциала**

Изменение митохондриального мембранного потенциала определяли с помощью флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 с использованием ратиометрического катионного флуоресцентного красителя 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide – JC-1 [Simeonova et al., 2004] («Biotium», США) в клетках растений, «MitoTracker Orange CMTRos» («Invitrogen», США) – МО в клетках дрожжей. Краситель JC-1 флуоресцирует в двух каналах. Мономеры красителя флуоресцируют в зеленом канале (514/529 нм), что регистрируют с использованием Filter set 10 (EX BP 450–490, BS FT 510, EM BP 565) [Suski et al., 2012]. Повышение потенциала на мембране приводит к образованию J-агрегатов, которые флуоресцируют в красном канале (590 нм), регистрацию производят с использованием Filter set 15 (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590). Краситель МО флуоресцирует в оранжевом канале (576 нм), флуоресценцию красителя оценивали при использовании Filter set 20 (EX BP 546/12, BS FT 560, EM BP 575-640).

Окрашивание клеток красителем JC-1 (10 мкМ) проводили в течение 10 мин, а МО (50 нМ) в течение 30 мин. В качестве положительного и отрицательного контроля при окрашивании использовали олигомицин (30 мкМ), СССР (4 мкМ) и 2,4 - динитрофенол – ДНФ (0,1; 0,5; 1 мМ). Изменение интенсивности флуоресценции красителей оценивали не менее

чем в 300 клетках в красном канале и выражали в процентах от контроля или в относительных единицах.

## **2.8. Выделение суммарного белка**

Для выделения суммарного белка клетки растений после соответствующих обработок фильтровали, промывали дистиллированной водой. Для выделения суммарного белка использовали 0,5 г сырой массы. Клетки замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до момента выделения белка. Для выделения белка размороженные клетки ресуспендировали в буфере для выделения белка (0,1 М Трис-НСl; 0,003 М ДДС-На; 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, рН 7,4–7,6) в соотношении 1:4, добавляли 0,5 – 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорида (ФМСФ) для ингибирования сериновых протеаз, замораживали жидким азотом и тщательно растирали с кварцевым песком. Грубые клеточные компоненты удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин с использованием центрифуги Allegra 64 R («Beckman Coulter», США). Белок из супернатанта осаждали трехкратным объемом охлажденного ацетона. Осадок белка растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-НСl, 0,008 М ДДС-На, 0,1 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 10% глицерин, рН 6,8), инкубировали 5 мин при  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали 15 мин при 5000 g, отбирали фракцию растворенного белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [Lowry et al., 1951]. Белок разводили в буфере для образца с 0,001 % бромфеноловым синим и использовали для электрофореза в концентрации около 10 мкг белка на трек.

## **2.9. Проведение электрофореза в ПААГе с ДДС-На**

Электрофорез проводили в блоках полиакриламидного геля размером 70\*80\*1 мм в модифицированной системе Лэммли [Laemmli, 1970], используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell («BIO-RAD», США).

Стеклянные пластины, одна из которых несколько длиннее другой (83\*102 и 73\*102 мм), вставляли в устройство для заливки геля, прилагаемое к прибору для электрофореза Mini-PROTEAN III. В просвет между стеклянными пластинами заливали раствор мелкопористого полиакриламидного геля, а затем после его полимеризации заливали крупнопористый гель. В последний погружали зубчатый шаблон для формирования карманов для нанесения белковых проб. Белковые пробы наносили на гель не более 10–70 мкг белка на трек.

Верхним и нижним электродными буферами служил трис-глицин, pH 8,3 (25 mM Трис-HCl и 192 mM глицин, содержащий 0,1% ДДС-Na). Рабочий гель полимеризовали в 0,0375 M Трис-HCl буфере, pH 8,8, содержащем 0,1% ДДС-Na, а формирующий гель в 0,0625 M Трис-HCl буфере, pH 6,8, содержащем 0,1% ДДС-Na. Разделяющий гель имел концентрацию 12,5% или 15% полиакриламида [Побежимова и др., 2004].

Первые полчаса, когда образцы входят в гель, устанавливали напряжение 50 В на блок. Далее электрофорез проводили при напряжении 180 В до тех пор, пока бромфеноловый синий не доходил до конца гелевого блока. После окончания электрофореза гель помещали в камеру для окрашивания или использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану и последующего иммуноблоттинга [Побежимова и др., 2004].

### **2.10. Окраска и обесцвечивание гелей**

После окончания электрофореза гели окрашивали в водном растворе, содержащем 0,1% Кумасси R-250, 25% изопропанол, 10% уксусную кислоту. Для обесцвечивания фона гели переносили в раствор, содержащий 7% уксусную кислоту и 12,5% изопропанол, и отмывали в течение нескольких часов.

### **2.11. Вестерн-блоттинг**

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в приборе Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell («BIO-RAD», США) в Towbin-буфере (25 mM Трис-HCl, 192 mM глицин, 10% метанол, pH 9,2).

После переноса белков мембрану окрашивали в 0,5% растворе Понсо, отмечая направление пробега и массы молекулярных маркеров. После этого мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 2% сухое обезжиренное молоко, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4) и 150 мМ NaCl (трис-солевой буфер, ТСБ), и оставляли на ночь при 0–4 °С. Затем отмывали 2 раза по 20 мин в ТСБ и заливали раствором первичных антител.

В работе были использованы антитела против Hsp101 («Agriser» AS 07253, Швеция), Hsp70 («Enzo Life Sciences SPA 820», США), Hsp60 («US Biological» H1830-77B, США), Hsp17.6C-1 («Agriser» AS 07254, Швеция), Hsp17.6C-2 («Agriser» AS 07255, Швеция).

Мембраны отмывали от непрореагировавших антител ТСБ, содержащим 0,05% Твин-20 (ТСБ-Твин), 3 раза по 5 мин, затем инкубировали со вторичными антителами. В работе использовали вторичные антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой. Время инкубации и разведение подбирали экспериментально в зависимости от используемых первичных антител. После инкубации мембрану вновь отмывали в ТСБ-Твин от непрореагировавших антител 2 раза по 10 мин, помещали в раствор, содержащий 100 мМ Трис-НСl (рН 9,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,17 мг/мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата, 0,33 мг/мл нитротетразолия синего, и инкубировали до появления окраски. Для сохранения окраски мембрану помещали в раствор, содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 2,9), 1 мМ ЭДТА, высушивали, сканировали и хранили в темном месте.

## **2.12. Статистическая обработка данных**

Данные были обработаны статистически. В работе приведены средние арифметические и их стандартные ошибки. В работе был использован коэффициент корреляции Пирсона, который рассчитывался с использованием программы SigmaPlot12.5.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### **3.1. Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток растений**

Умеренное тепловое воздействие приводит к повышению содержания БТШ, которые участвуют в защите клетки от гибели. Одним из сигналов, приводящих к индукции синтеза БТШ, является повышение генерации АФК. Митохондрии являются одним из сайтов продукции АФК в клетке. Чтобы исключить вклад хлоропластов как основного источника в продукцию АФК в работе использовали гетеротрофную культуру клеток растений, а также дрожжи. Изучали изменение содержания АФК, электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий, внутриклеточного гомеостаза кальция и жизнеспособность клеток при температурном воздействии.

##### ***3.1.1. Содержание БТШ при действии ряда повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника***

Известно, что экспрессия генов *HSP101*, *HSP70*, *HSP60*, *sHSP* повышается при тепловом воздействии в растениях *A. thaliana* [Vierling, 1991; Wang et al., 2004; Rikhvanov et al., 2007]. БТШ выполняют функции молекулярных шаперонов. После температурного воздействия они восстанавливают поврежденные при нагревании белки [Kubota et al., 2009]. Так, например, Hsp101 играет центральную роль в выживании арабидопсиса при воздействии повышенной температуры [Hong, Vierling, 2000; Queitsch et al., 2000]. Подобные данные получены на озимой пшенице [Campbell et al., 2001; Gullì et al., 2007]. Как правило, экспрессию генов БТШ у растений изучают при температуре теплового воздействия 37–39 °С. Показано, что в растениях пшеницы при температуре 37 °С повышается экспрессия *HSP101*, *HSP26* и *HSP70* [Liu et al., 2003; Gullì et al., 2007]. Наряду с экспрессией генов БТШ, увеличивается уровень АФК. У ряда других растений генерацию АФК

наблюдали при довольно широком температурном диапазоне: от 37 до 55 °С [Volkov et al., 2006; Locato et al., 2008]. Чтобы обнаружить связь между АФК и синтезом БТШ у исследуемых объектов, в нашей работе изучали изменение содержания БТШ в диапазоне 37–50 °С. Культуры клеток озимой пшеницы и тростника, выращенные при 26 °С, подвергали воздействию повышенных температур 37 °С (120 мин), 39 °С (120 мин), 43 °С (60 мин), 46 °С (40 мин), 50 °С (10 мин). Содержание БТШ оценивали после восстановительного периода (26 °С, 120 мин).

Содержание отдельных БТШ оценивалось методом вестерн-блоттинга с использованием антител, полученных на БТШ арабидопсиса (Hsp101, Hsp17.6I, Hsp17.6II) и человека (Hsp70, Hsp60). Как видно из рис. 1 А, Б, все используемые антитела реагировали с белками суспензионных клеток пшеницы и тростника. Было зарегистрировано увеличение количества белков с молекулярными массами 101, 70, 60, 17,6 кДа. Способность антител, полученных на БТШ арабидопсиса, реагировать с белками озимой пшеницы и сахарного тростника подтверждает высокую консервативность БТШ у различных видов.

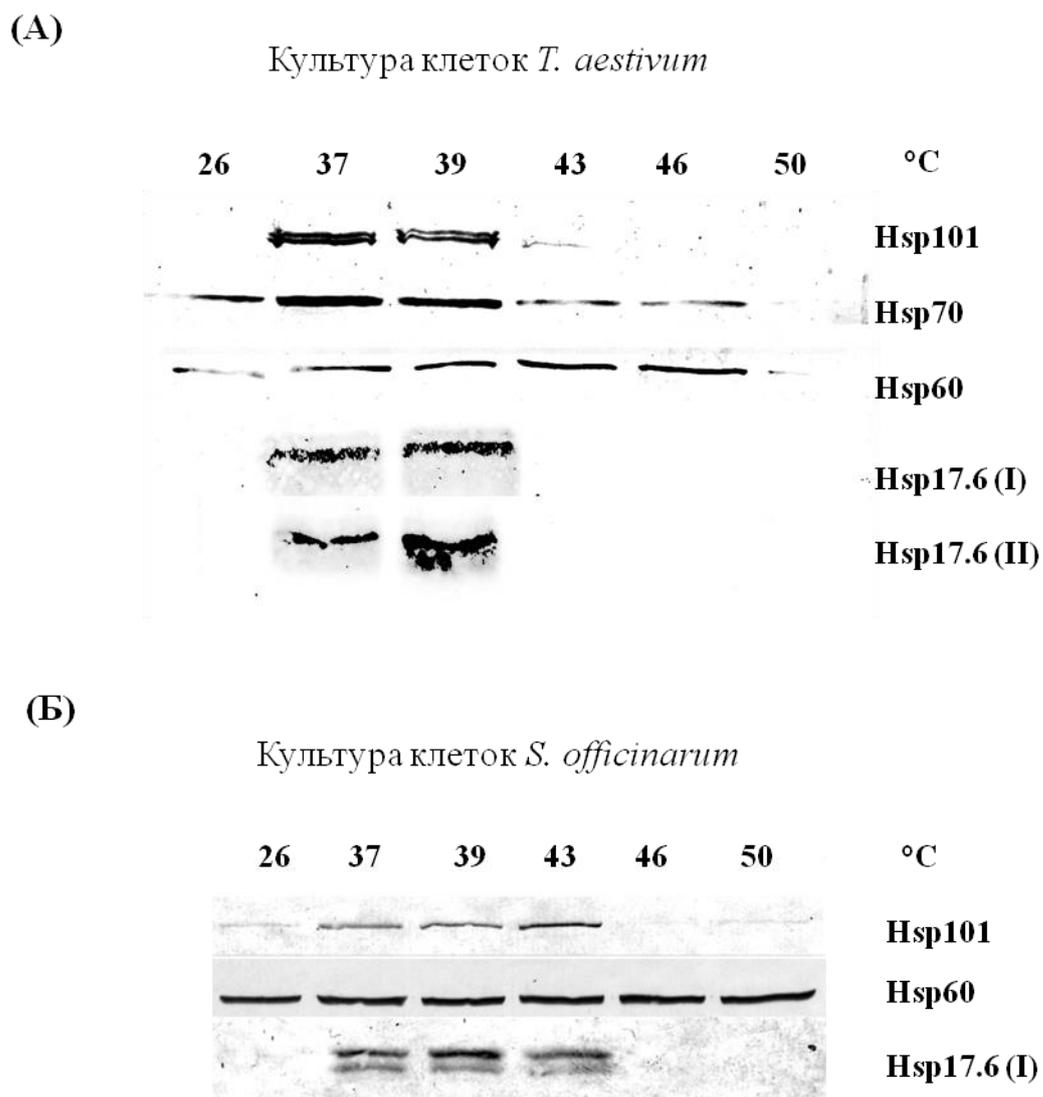
Согласно полученным результатам, представленным на рис. 1 А, в клетках культуры озимой пшеницы в контрольных условиях (26 °С) белки Hsp101 и Hsp17.6 практически не регистрировались. Повышение температуры до 37–39 °С приводило к увеличению содержания этих белков. При более высоких температурах (46 и 50 °С) содержание упомянутых БТШ не изменялось, по сравнению с контролем (26 °С) (рис. 1 А). Содержание белка Hsp70 в контрольных условиях в клетках пшеницы (рис. 1 А) было достаточно значительным, но при тепловом воздействии (37–39 °С) наблюдалось дополнительное его повышение. Воздействие более высоких температур не приводило к повышению содержания Hsp70. В отличие от вышеуказанных белков изменение содержания Hsp60 происходило иным образом. Воздействие при 37 °С не увеличивало количество Hsp60 по сравнению с контролем. В то же время инкубация клеток культуры озимой

пшеницы при 39 °С и выше индуцировала увеличение содержания данного белка (рис. 1 А).

Аналогичные эксперименты с использованием культуры клеток сахарного тростника показали, что в контрольных условиях (26 °С) белки Hsp101 и Hsp17.6 практически не детектировались (рис. 1 Б). Однако инкубация при температурах от 37 до 43 °С повышала содержание этих белков. При действии более высоких температур повышения содержания данных белков не наблюдалось. Содержание Hsp60 не изменялось при всех использованных температурных обработках (рис. 1 Б).

При изучении влияния теплового воздействия на изменение содержания БТШ в культурах озимой пшеницы и сахарного тростника были выявлены различия в диапазоне, при котором происходит повышение содержания БТШ. У пшеницы – максимум индукции синтеза Hsp101, Hsp17.6 наблюдался при 37 и 39 °С (рис. 1 А). У тростника максимальное повышение содержания вышеуказанных белков происходило в диапазоне от 37 до 43 °С (рис. 1 Б). Таким образом, у сахарного тростника синтез БТШ происходит при более высокой температуре (43 °С). Однако, в отличие от пшеницы, содержание Hsp60 у тростника не изменялось с увеличением интенсивности теплового воздействия. По-видимому, диапазоны температур, при которых наблюдается содержание БТШ, определяются различными температурными условиями, необходимыми для развития и роста озимой пшеницы и сахарного тростника.

Таким образом, максимальное накопление изучаемых БТШ происходит в определенном температурном диапазоне, превышение и понижение которого не приводит к увеличению содержания данных белков.



**Рис. 1.** Содержание белков теплового шока Hsp101, Hsp70, Hsp60, Hsp17.6 в клетках суспензионных культур *T. aestivum* (А) и *S. officinarum* (Б) в контрольных условиях (26 °С) и при тепловом воздействии различной интенсивности (37 °С – 120 мин, 39 °С – 120 мин, 43 °С – 60 мин, 46 °С – 40 мин, 50 °С – 10 мин). Приведены данные характерного эксперимента. n=3.

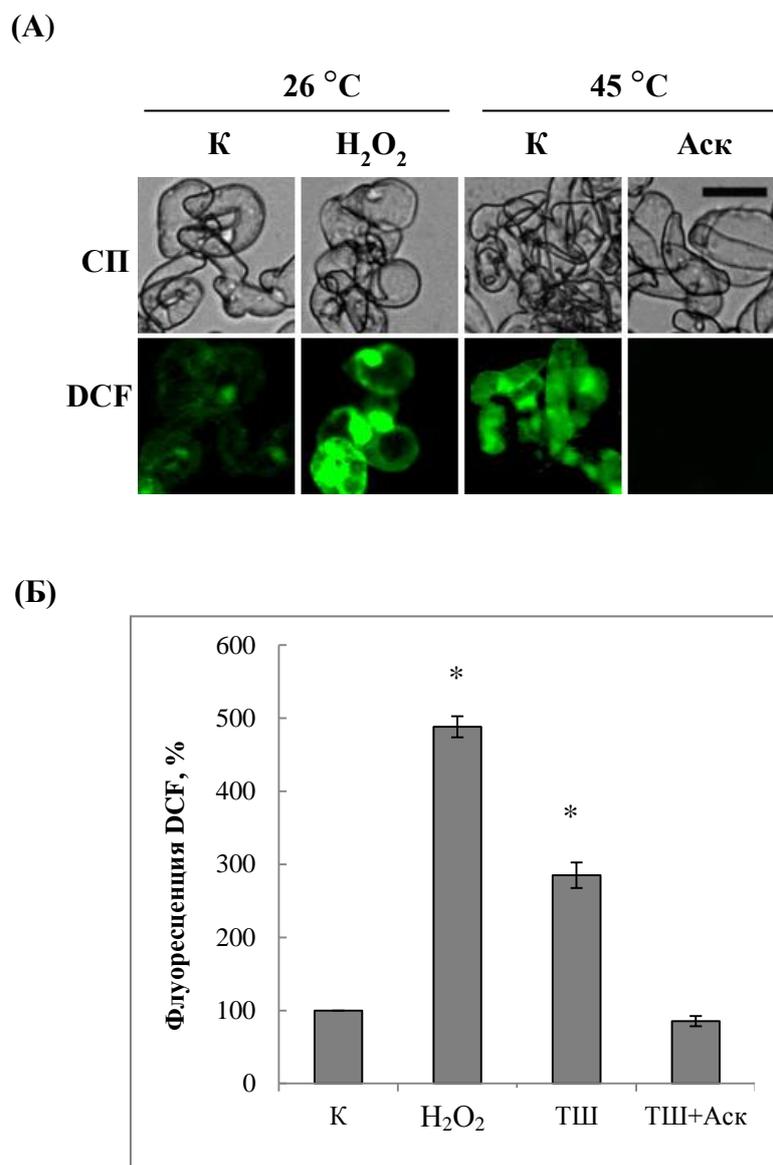
### ***3.1.2. Изменение уровня АФК при действии повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника***

#### ***3.1.2.1. Тепловое воздействие вызывает усиление продукции АФК***

Одним из сигналов запуска синтеза белков стресса является повышение до определенного уровня содержания АФК [Колупаев и др., 2013; Гарифзянов и др., 2011; Креславский и др., 2012; Miller, Mittler, 2006; Baxter et al., 2014]. Поэтому необходимо было оценить изменение содержания АФК в изучаемых культурах. Сначала необходимо было установить, происходит ли данный процесс при тепловом воздействии в суспензионных культурах озимой пшеницы и сахарного тростника. Для решения данной задачи использовали флуоресцентный краситель  $H_2DCF \cdot DA$  (рис. 2) в клетках, инкубируемых в контрольных условиях и при тепловом воздействии.  $H_2DCF \cdot DA$  при деацетилировании эстеразами превращается в  $H_2DCF$ . В присутствии АФК  $H_2DCF$  окисляется до DCF, который флуоресцирует в зеленом канале [Suski et al., 2012]. Как показано на рис. 2, действие повышенной температуры (45 °С, 30 мин) на клетки приводило к значительному увеличению флуоресценции данного красителя. В качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно, использовали антиоксидант – аскорбиновую кислоту и источник АФК – пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) (рис. 2). Добавление аскорбиновой кислоты при тепловом воздействии подавляло повышение флуоресценции DCF. Наоборот, добавление  $H_2O_2$  контрольным клеткам, инкубируемым при 26 °С, повышало флуоресценцию DCF (рис. 2).

Способность аскорбиновой кислоты и  $H_2O_2$  ингибировать и повышать, соответственно, флуоресценцию DCF указывает на то, что изменение флуоресценции данного красителя корректно отражает изменение содержания АФК.

Таким образом, тепловое воздействие приводит к увеличению содержания АФК в клетках озимой пшеницы.



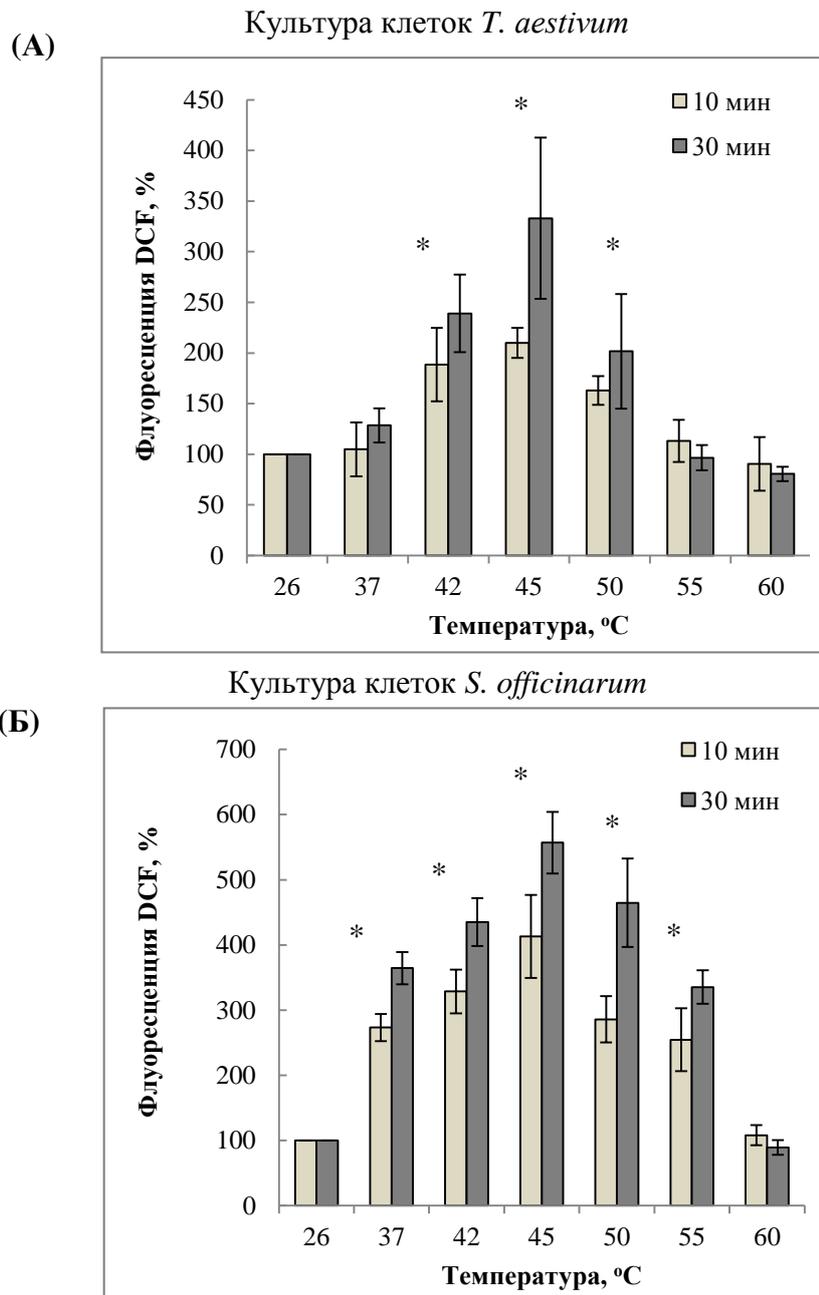
**Рис. 2.** Тепловое воздействие вызывает повышение содержания АФК в культуре клеток *T. aestivum*.

(А) Микрофотографии клеток озимой пшеницы после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и аскорбиновой кислотой. (Б) Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF. К – клетки контрольной культуры, инкубируемые при 26 °С. Обработку 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> проводили при 26 °С. ТШ – тепловой шок 45 °С, 30 мин. Обработку 100 мМ аскорбиновой кислотой проводили при 45 °С, 30 мин (ТШ+Аск). Флуоресценцию красителя DCF (зеленый канал) измеряли сразу же после воздействия. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости p≤0,05.

### *3.1.2.2. Образование АФК в зависимости от интенсивности теплового воздействия*

Далее необходимо было установить, как повлияют температурные обработки: 37, 42, 45, 50, 55 и 60 °С на изменение уровня АФК в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника. Как показано на рис. 3 А, инкубация клеток культуры озимой пшеницы при температуре 42 °С приводила к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции DCF по сравнению с контролем (26 °С). Однако значительное увеличение флуоресценции данного красителя в культуре клеток сахарного тростника происходило уже при температуре 37 °С (рис. 3 Б). При тепловом воздействии 45 °С отмечался пик флуоресценции у обеих изучаемых культур клеток (рис. 3 А, Б). При повышении воздействия до 50 °С флуоресценция DCF была ниже, чем при 45 °С (рис. 3 А, Б). Интенсивность флуоресценции при более высоких температурах, таких как 60 °С (рис. 3 А, Б), не отличалась от контрольных значений. В отличие от озимой пшеницы в клетках тростника во время инкубации при 55 °С флуоресценция DCF была выше, чем в контроле. Следует также отметить, что более длительное тепловое воздействие (в течение 30 мин) приводило, как правило, к более интенсивной флуоресценции красителя, чем короткое (в течение 10 мин).

Таким образом, способность клеток озимой пшеницы и сахарного тростника образовывать АФК при тепловых воздействиях наблюдается только в определенном диапазоне температур, характерном для каждого вида (от 42 до 50 °С для озимой пшеницы; от 37 до 55 °С для сахарного тростника). Различный уровень продукции АФК в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника подтверждает, что ответная реакция на тепловое воздействие у этих видов существенно отличается.



**Рис. 3.** Изменение содержания АФК при тепловом воздействии различной интенсивности в культуре клеток *T. aestivum* (А) и *S. officinarum* (Б).

Культуру клеток обрабатывали в течение 10 и 30 мин при указанных температурах и проводили измерение флуоресценции DCF. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °C (для 10 и 30 мин).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### ***3.1.3. Изменение потенциала на внутренней мембране митохондрий при действии повышенных температур у суспензионных культур клеток озимой пшеницы и сахарного тростника***

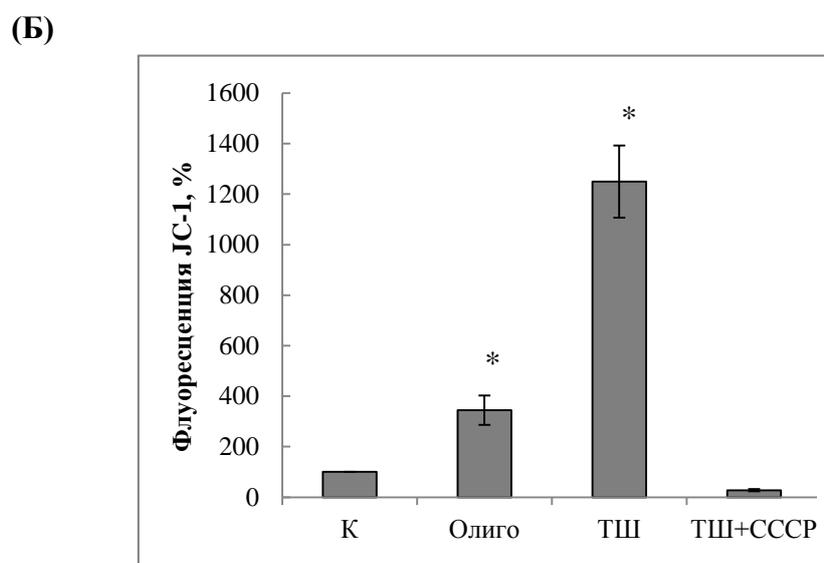
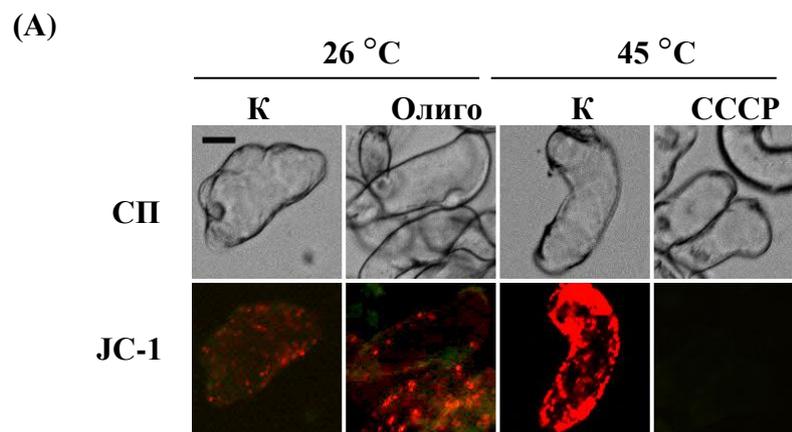
#### ***3.1.3.1. Тепловое воздействие вызывает повышение митохондриального мембранного потенциала***

Известно, что у клеток табака и арабидопсиса при тепловом воздействии в образовании АФК принимают участие митохондрии [Vassa et al., 2004; Zhang et al., 2009]. На изолированных митохондриях млекопитающих и растений показано, что причиной усиления генерации АФК может служить увеличение митохондриального потенциала (гиперполяризация) [Korshunov et al., 1997; Casolo et al., 2000; Starkov et al., 2002]. Изначально необходимо было установить, как повлияет тепловое воздействие на изменение МП.

Поэтому определяли, как изменяется потенциал при тепловом воздействии в суспензионной культуре озимой пшеницы. Для решения данной задачи измеряли флуоресценцию JC-1. JC-1 является нетоксичным флуоресцентным зондом для определения потенциала, генерируемого митохондриями. Мономеры JC-1 избирательно накапливаются в митохондриях и при повышении потенциала образуют J-агрегаты, флуоресцирующие в красном канале [Suski et al., 2012; Szilagyi et al., 2006]. Как показано на рис. 4, в контрольных условиях интенсивность флуоресценции JC-1 в клетках озимой пшеницы была незначительной. Тепловая обработка приводила к резкому увеличению флуоресценции в красном канале. Чтобы доказать, что изменение интенсивности флуоресценции JC-1 отображает изменение МП, использовали отрицательный (протонофор CCCP) и положительный (ингибитор сектора  $F_0$  АТФ-синтазы – олигомицин) контроли. В нормальных условиях МП формируется в результате баланса между переносом протонов на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны в процессе функционирования дыхательной цепи и их обратного транспорта в

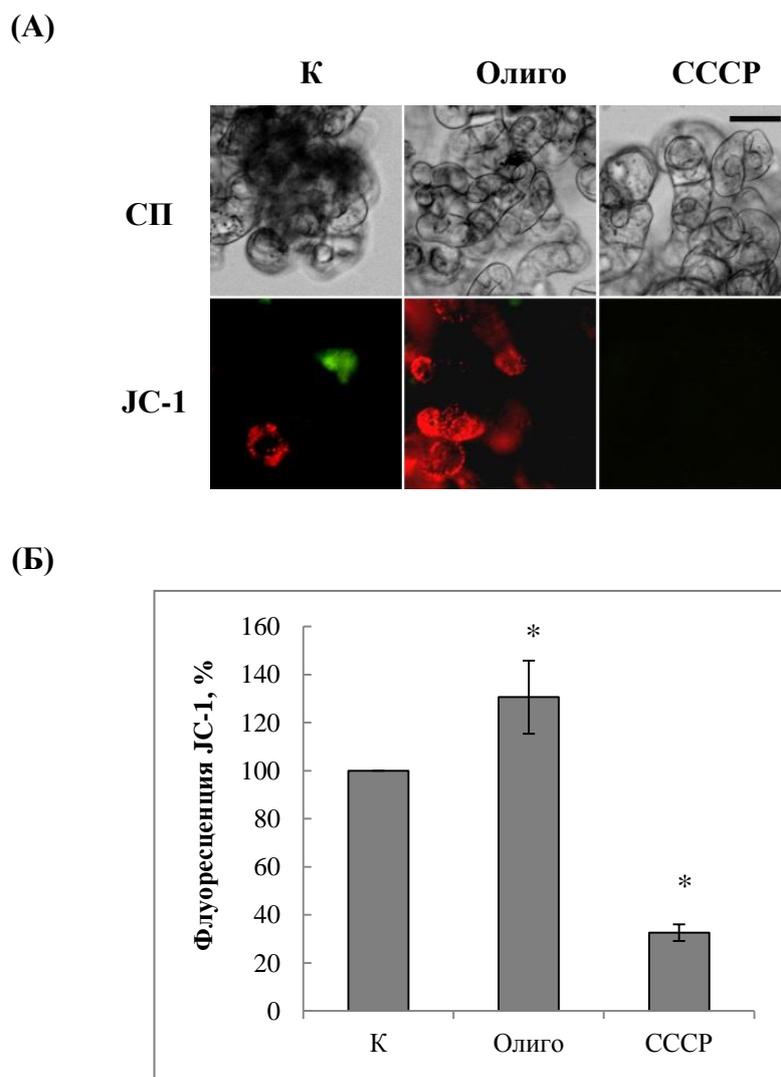
митохондриальный матрикс за счет работы фермента  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы [Skulachev, 1998]. При добавлении СССР происходит свободный транспорт протонов через митохондриальную мембрану и рассеивание митохондриального мембранного потенциала. При добавлении олигомицина, ингибитора мембранного сектора  $F_0$  фермента  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы, не происходит обратного транспорта протонов, а митохондриальный потенциал, наоборот, повышается [Suski et al., 2012]. Инкубация клеток в присутствии СССР подавляла повышение интенсивности флуоресценции JC-1 в красном канале при тепловом воздействии. Напротив, обработка контрольных клеток озимой пшеницы олигомицином вызывала увеличение флуоресценции JC-1 в красном канале (рис. 4). Подобные эффекты наблюдали у клеток культуры сахарного тростника (рис. 5). Добавление протонофора СССР вызывало снижение флуоресценции JC-1 при обычной температуре инкубации, а олигомицин повышал флуоресценцию красителя (рис. 5). Способность СССР и олигомицина, соответственно, ингибировать и повышать флуоресценцию JC-1 в красном канале доказывает, что изменение флуоресценции JC-1 соответствует изменению МП.

Таким образом, тепловое воздействие приводит к увеличению потенциала на внутренней мембране митохондрий в клетках озимой пшеницы.



**Рис. 4.** Тепловое воздействие вызывает повышение митохондриального потенциала в культуре клеток *T. aestivum*.

(А) Микрофотографии клеток озимой пшеницы после обработки олигомицином и протонофором СССР. (Б) Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1. К – клетки контрольной культуры, инкубируемые при 26 °С. Обработку 30 мкМ олигомицином (Олиго) проводили при 26 °С. ТШ – тепловой шок 45 °С, 30 мин. Обработку 4 мкМ СССР проводили при 45 °С, 30 мин (ТШ+СССР). Флуоресценцию красителя JC-1 (красный канал) измеряли сразу же после воздействия. За 100% принимали флуоресценцию клеток культуры при 26 °С. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 20 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 5.** Эффект олигомицина и СССР на митохондриальный потенциал в культуре клеток *S. officinarum*.

(А) Микрофотографии клеток сахарного тростника после обработки олигомицином и протонофором СССР. (Б) Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1. В контрольную культуру клеток *S. officinarum* (К) добавляли 50 мкМ олигомицина (Олиго) или 4 мкМ СССР (СССР). Флуоресценцию красителя JC-1 (красный канал) измеряли сразу же после воздействия. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 20 мкм. n=3. М±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### *3.1.3.2. Повышение митохондриального мембранного потенциала в зависимости от интенсивности теплового воздействия в клетках озимой пшеницы*

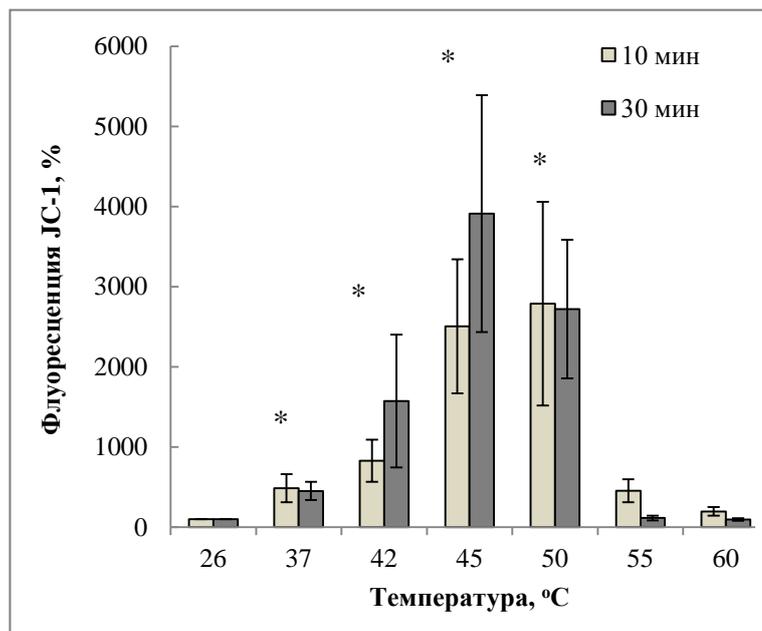
Чтобы определить как изменяется значение МП в зависимости от интенсивности теплового воздействия, клетки озимой пшеницы подвергали тепловым воздействиям при 37, 42, 45, 50, 55 и 60 °С в течение 10 и 30 мин, затем инкубировали с красителем JC-1, измеряли флуоресценцию в красном канале. Как показано на рис. 6 А, тепловое воздействие при 37 °С повышало флуоресценцию JC-1. Максимальное увеличение флуоресценции по сравнению с контролем (26 °С) наблюдалось при тепловой обработке 45 °С. Увеличения флуоресценции JC-1 не происходило, если температуру теплового воздействия повышали до 55 и 60 °С (рис 6 А). Достоверных различий по флуоресценции красителя в культуре клеток озимой пшеницы в зависимости от времени теплового воздействия (10 и 30 мин) не было обнаружено (рис. 6 А).

Таким образом, повышение температуры приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны в клетках озимой пшеницы. Однако повышение МП происходит в определенном температурном диапазоне (от 37 до 50 °С). В случае превышения этого диапазона гиперполяризации не наблюдается.

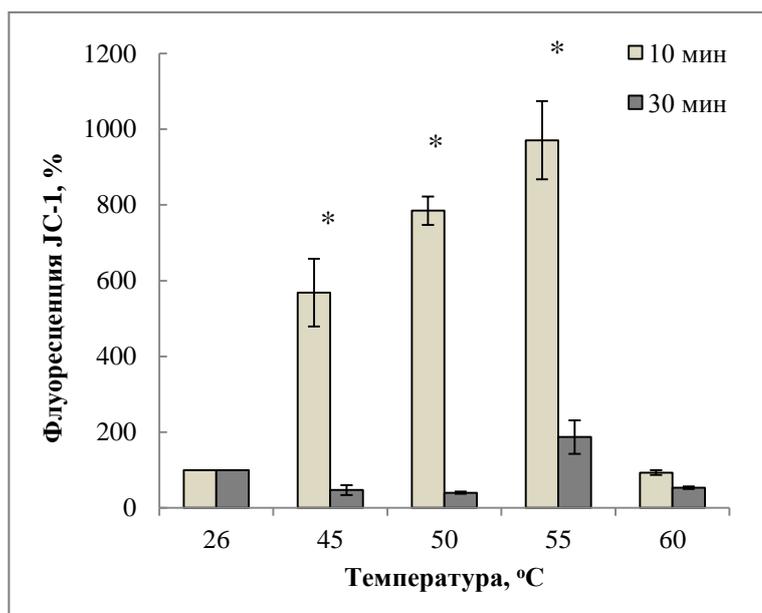
### *3.1.3.3. Повышение митохондриального мембранного потенциала в зависимости от интенсивности теплового воздействия в клетках сахарного тростника*

При изучении изменения МП в культуре клеток сахарного тростника при тепловых воздействиях: 37, 42, 45, 50, 55 и 60 °С в течение 10 и 30 мин были получены несколько иные данные (рис. 6 Б), чем в культуре клеток озимой пшеницы (рис. 6 А). Тепловая обработка в течение 10 мин при температуре 45–55 °С приводила к повышению МП (рис. 6 Б) точно так же, как и в клетках озимой пшеницы (рис. 6 А). Максимальная гиперполяризация

(А) Культура клеток *T. aestivum*



(Б) Культура клеток *S. officinarum*



**Рис. 6.** Изменение митохондриального потенциала при тепловом воздействии различной интенсивности в клетках культур *T. aestivum* (А) и *S. officinarum* (Б). Культуру клеток инкубировали в течение 10 и 30 мин при указанных температурах и проводили измерение флуоресценции JC-1 в красном канале. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °C (для 10 и 30 мин).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

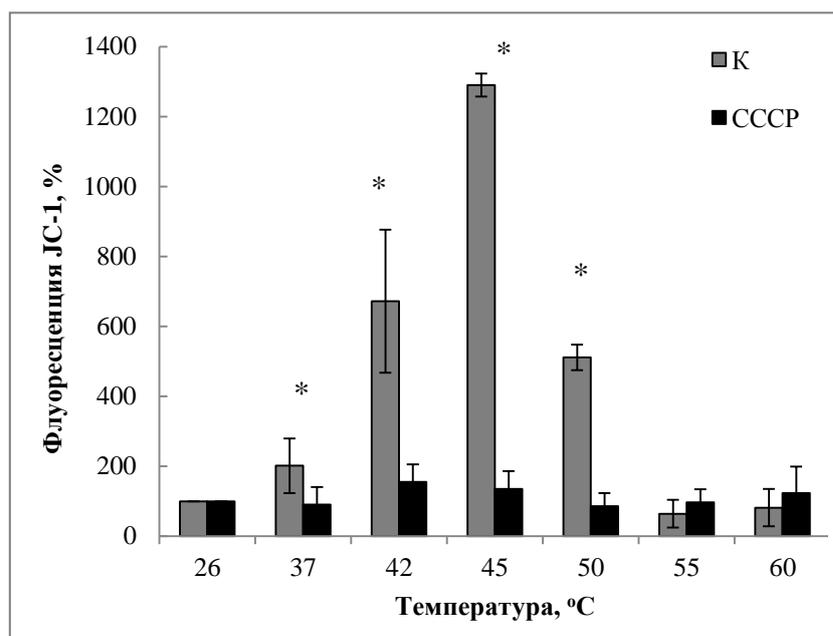
внутренней мембраны митохондрий наблюдалась при тепловом воздействии 55 °С в течение 10 мин. Если тепловое воздействие повышали до 60 °С, то увеличения флуоресценции JC-1 в культуре клеток не происходило.

В отличие от культуры клеток пшеницы (рис. 6 А) в клетках сахарного тростника обработка в течение 30 мин в диапазоне температур от 45 до 55 °С не вызывала повышения митохондриального мембранного потенциала. Напротив, в этих условиях эксперимента, как правило, наблюдалось снижение МП ниже контрольного уровня.

Таким образом, температурный максимум гиперполяризации различается в зависимости от использованного объекта. В случае клеток сахарного тростника (рис. 6 Б) увеличение МП наблюдается при более интенсивном тепловом воздействии (55 °С, 10 мин) по сравнению с клетками пшеницы, у которых максимум увеличения МП наблюдался при 45 °С. В культуре сахарного тростника кратковременные воздействия (10 мин) приводят к гиперполяризации митохондриальной мембраны, которая при длительном тепловом воздействии (30 мин) сменяется деполяризацией.

#### *3.1.3.4. Эффект CCCP на изменение МП в клетках озимой пшеницы при температурных воздействиях различной интенсивности*

Ранее было показано, что протонофор CCCP снижает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в культуре клеток озимой пшеницы (рис. 4). Поэтому необходимо было установить, зависит ли от активности митохондрий повышение флуоресценции JC-1 при всех использованных температурных обработках. Для этого культуру клеток озимой пшеницы обрабатывали в течение 10 мин, как описано выше, с добавлением в среду инкубации протонофора CCCP. Подтверждая описанные выше результаты (рис. 6 А), тепловое воздействие (37–50 °С) приводило к увеличению МП в клетках пшеницы (рис. 7). Однако присутствие CCCP во время инкубации при тепловом воздействии 37–50 °С подавляло индуцированное тепловым воздействием повышение потенциала.



**Рис. 7.** Эффект CCCP на повышение МП при тепловых воздействиях в культуре клеток *T. aestivum*.

Культуру клеток обрабатывали при указанных температурах (в течение 10 мин) в присутствии 4 мкМ CCCP. Флуоресценцию красителя JC-1 (красный канал) измеряли сразу же после воздействия. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °C в отсутствие (К) или присутствии CCCP. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

Обработка протонофором при температурах 55 и 60 °С в течение 10 мин не влияла на флуоресценцию JC-1. Способность протонофора СССР подавлять повышение флуоресценции JC-1 при тепловом воздействии в диапазоне 37–50 °С свидетельствует, что изменение флуоресценции JC-1 в красном канале отражает повышение МП.

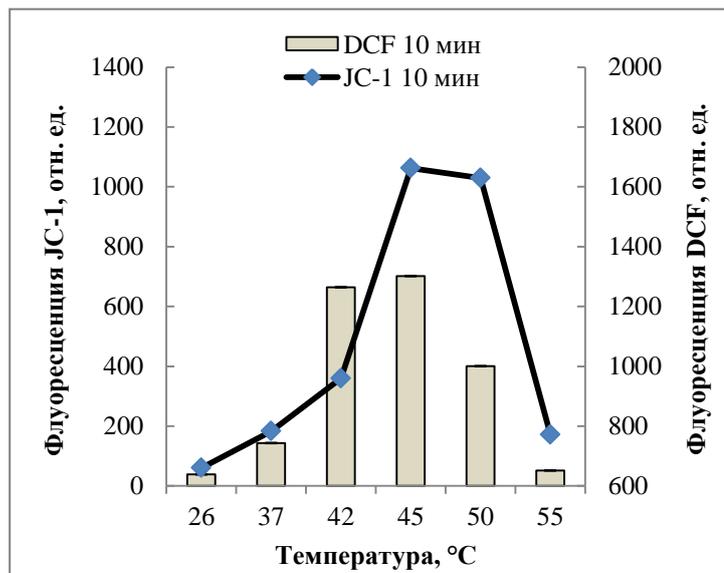
#### ***3.1.4. Сравнение интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF после теплового воздействия различной интенсивности***

На изолированных митохондриях и клетках млекопитающих в отсутствие стрессового воздействия показана связь между значением МП и продукцией АФК [Korshunov et al., 1997; Suski et al., 2012]. Чтобы изучить, наблюдается ли данное явление в клетках растений при тепловом воздействии, сравнили интенсивность флуоресценции JC-1 и DCF (рис. 8 и рис. 9) после инкубации при повышенных температурах в течение 10 и 30 мин.

В клетках озимой пшеницы увеличение температуры с 37 до 45 °С приводило к одновременному повышению флуоресценции обоих красителей, а более высокие температуры (50 и 55 °С) вызывали ее снижение (рис. 8). Коэффициент корреляции между флуоресценцией DCF и JC-1 составил 0,73 (10-мин обработка) (рис. 8 А) и 0,94 (30-мин) (рис. 8 Б). Таким образом, анализ интенсивности флуоресценции DCF (рис. 3 А) и JC-1 (рис. 6 А) в клетках озимой пшеницы показывает, что флуоресценция этих красителей изменяется сходным образом. Полученный результат указывает на вероятную взаимосвязь между повышением митохондриального мембранного потенциала и содержанием АФК в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии.

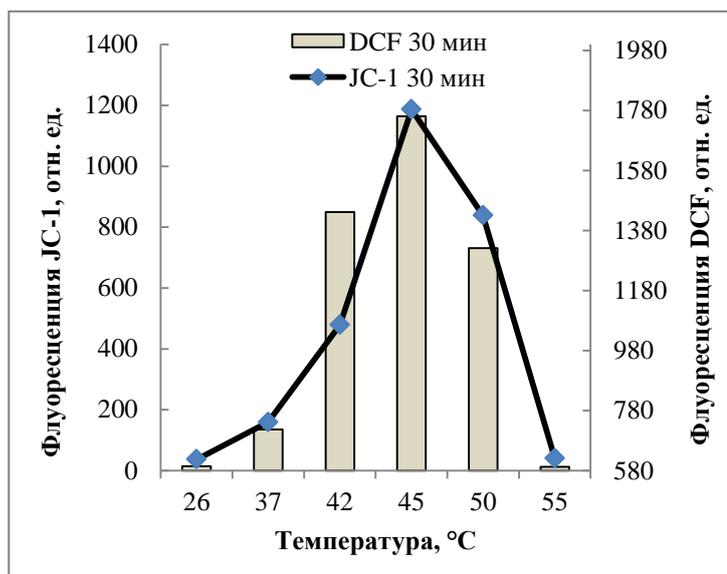
Сравнение интенсивности флуоресценции DCF и JC-1 (рис. 9) в культуре клеток сахарного тростника показало, что при тепловом воздействии в диапазоне температур 45–50 °С в течение 10 мин наблюдается повышение флуоресценции обоих красителей. При температуре 60 °С флуоресценция красителей снижалась до контрольного уровня. Коэффициент

(А)



Коэффициент  
корреляции  
0,743959

(Б)

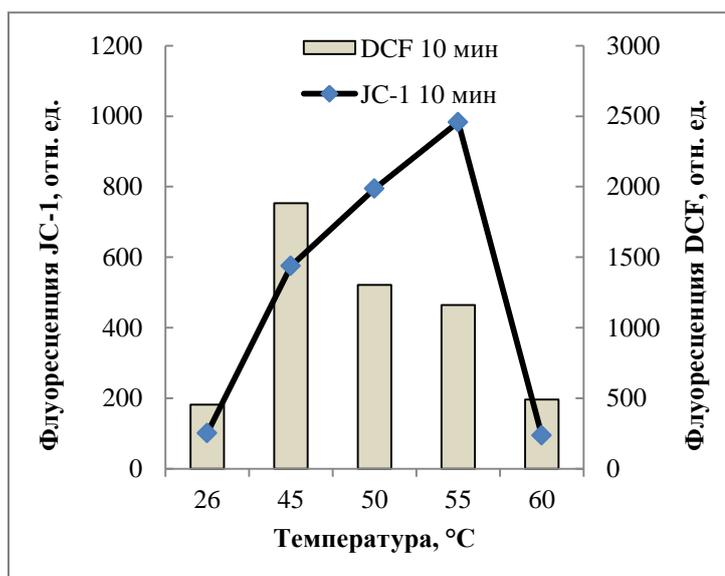


Коэффициент  
корреляции  
0,944124

**Рис. 8.** Сравнение интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF клеток культуры *T. aestivum* после теплового воздействия различной интенсивности.

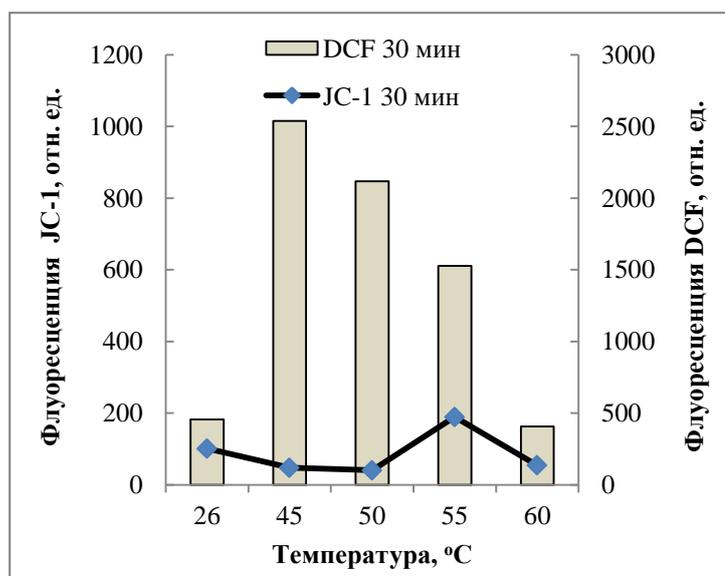
(А) клетки культуры после воздействия при указанных температурах в течение 10 мин. (Б) клетки культуры после воздействия при указанных температурах в течение 30 мин.

(А)



Коэффициент  
корреляции  
0,677528

(Б)



Коэффициент  
корреляции  
-0,192

**Рис. 9.** Сравнение интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF клеток культуры *S. officinarum* после теплового воздействия различной интенсивности.

(А) клетки культуры после воздействия при указанных температурах в течение 10 мин. (Б) клетки культуры после воздействия при указанных температурах в течение 30 мин.

корреляции между этими показателями составил 0,67 (рис. 9 А). Следовательно, после 10 мин теплового воздействия в культуре клеток сахарного тростника, так же как и в культуре клеток озимой пшеницы, вероятно, наблюдается связь между повышением продукции АФК и значением МП.

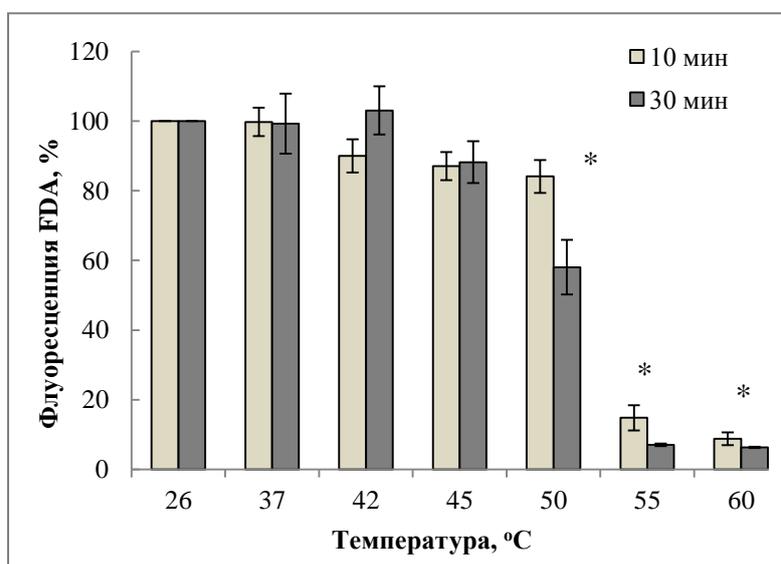
В то же время при тепловом воздействии в течение 30 мин в клетках сахарного тростника корреляция между уровнем АФК и значением МП отсутствует (рис. 9 Б). В этом случае, так же как и после 10 мин воздействия в диапазоне температур 45–55 °С происходило увеличение продукции АФК. Однако повышения МП не происходило. Напротив, было зарегистрировано снижение значения МП до контрольного уровня и ниже. Коэффициент корреляции между этими показателями (рис. 9 Б) при данной длительности обработки оказался равен –0,19.

Очевидно, что увеличение содержания АФК у различных видов растений при тепловом воздействии не всегда сопровождается повышением МП. У культуры клеток озимой пшеницы эти параметры повышаются одновременно вне зависимости от продолжительности действия стрессового фактора в данных условиях эксперимента (10 и 30 мин). У сахарного тростника на начальной стадии теплового воздействия (10 мин) также наблюдается синхронное повышение уровня АФК и МП, однако на более поздней стадии (30 мин) связь между этими показателями отсутствует.

### ***3.1.5. Изменение интенсивности флуоресценции FDA при действии повышенных температур у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы***

Одновременное повышение содержания АФК и увеличение МП в клетках озимой пшеницы наблюдалось при тепловом воздействии в диапазоне от 42 до 50 °С (рис. 8). Однако нельзя было исключить, что наблюдаемый результат является следствием неспецифического поступления флуоресцентных красителей – DCF и JC-1 в результате нарушения проницаемости плазматической мембраны. Чтобы исключить такую

вероятность, провели изучение интенсивности флуоресценции FDA при аналогичных условиях тепловой обработки. Краситель FDA используется для определения количества живых клеток после теплового воздействия [Reape et al., 2008]. Измерение флуоресценции FDA показало, что в отличие от DCF (рис. 3 А) и JC-1 (рис. 6 А) повышения флуоресценции FDA в диапазоне воздействия от 37 до 45 °С не происходило (рис. 10). Интенсивность флуоресценции FDA не зависела от времени обработки (10 и 30 мин). Следовательно, в диапазоне теплового воздействия от 37 до 45 °С не наблюдается неспецифического поступления в клетку JC-1 (рис. 6) и DCF (рис. 3), и данные, полученные с использованием этих красителей, отражают синхронное повышение изменения МП и АФК. Воздействие при более высоких температурах (50–60 °С) приводило к снижению интенсивности флуоресценции FDA (рис. 10), что по всей вероятности свидетельствует о нарушении эстеразной активности в клетках, подвергнутых жесткому повреждающему тепловому воздействию.



**Рис. 10.** Изменение интенсивности флуоресценции FDA в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии различной интенсивности.

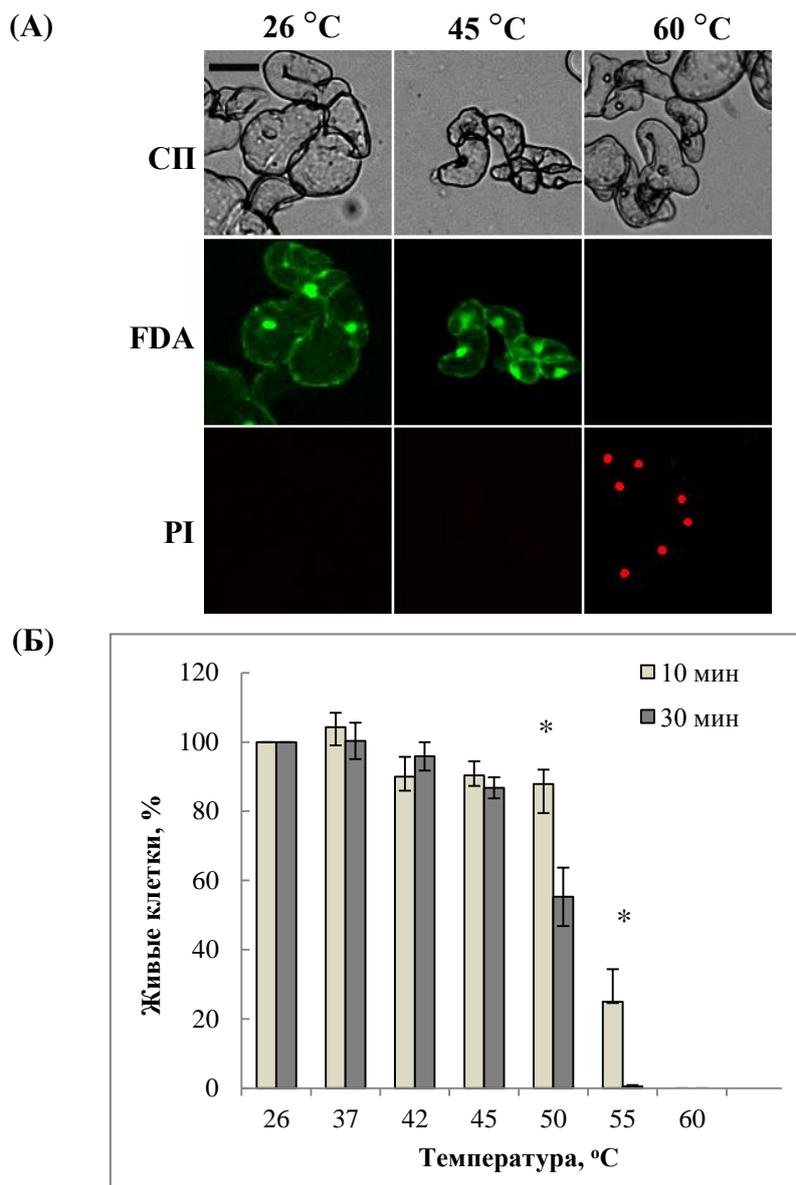
Культуру клеток обрабатывали в течение 10 и 30 мин при указанных температурах и проводили измерение флуоресценции. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С (для 10 и 30 мин).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### ***3.1.6. Изменение жизнеспособности клеток суспензионных культур при действии повышенных температур***

#### ***3.1.6.1. Жизнеспособность клеток культуры озимой пшеницы в зависимости от интенсивности теплового воздействия***

Тепловое воздействие на клетки озимой пшеницы и сахарного тростника приводит к увеличению продукции АФК. Повышенный уровень АФК в клетке может вызывать ее гибель. В связи с этим необходимо было определить жизнеспособность клеток культуры при тепловом воздействии различной интенсивности. Для этого суспензионную культуру озимой пшеницы обрабатывали инкубировали при 37, 42, 45, 50, 55, 60 °С (в течение 10 и 30 мин) и оценивали жизнеспособность сразу после обработки, подсчитывая количество клеток, окрашиваемых FDA или PI. Краситель FDA используется для определения живых клеток. Этот краситель, проникая в клетку, под действием эндогенных эстераз превращается во флуоресцеин, флуоресцирующий в зеленом канале. Краситель PI используется для определения мертвых и погибающих клеток с нарушениями в проницаемости плазмалеммы. В клетке PI, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, флуоресцирует в красном канале (рис. 11 А). Как показано на рис. 11 Б, инкубация в диапазоне температур от 37 до 45 °С не влияла на жизнеспособность клеток культуры озимой пшеницы сразу после обработки. Тепловое воздействие 50 °С (в течение 30 мин) снижало жизнеспособность приблизительно на 50%. Более жесткое тепловое воздействие при 55 и 60 °С в течение 30 мин приводило практически к мгновенной гибели клеток (рис. 11 Б).

Сопоставив данные изменения флуоресценции FDA (рис. 10) и количества живых клеток пшеницы (рис. 11 Б), можно сделать вывод, что интенсивность флуоресценции FDA (рис. 10) при тепловом воздействии отражает жизнеспособность (рис. 11 Б). Изменение этих показателей при данных условиях теплового воздействия происходило синхронно. Таким образом, несмотря на высокий уровень АФК (рис. 3 А), воздействие



**Рис. 11.** Жизнеспособность клеток культуры *T. aestivum* сразу после теплового воздействия различной интенсивности.

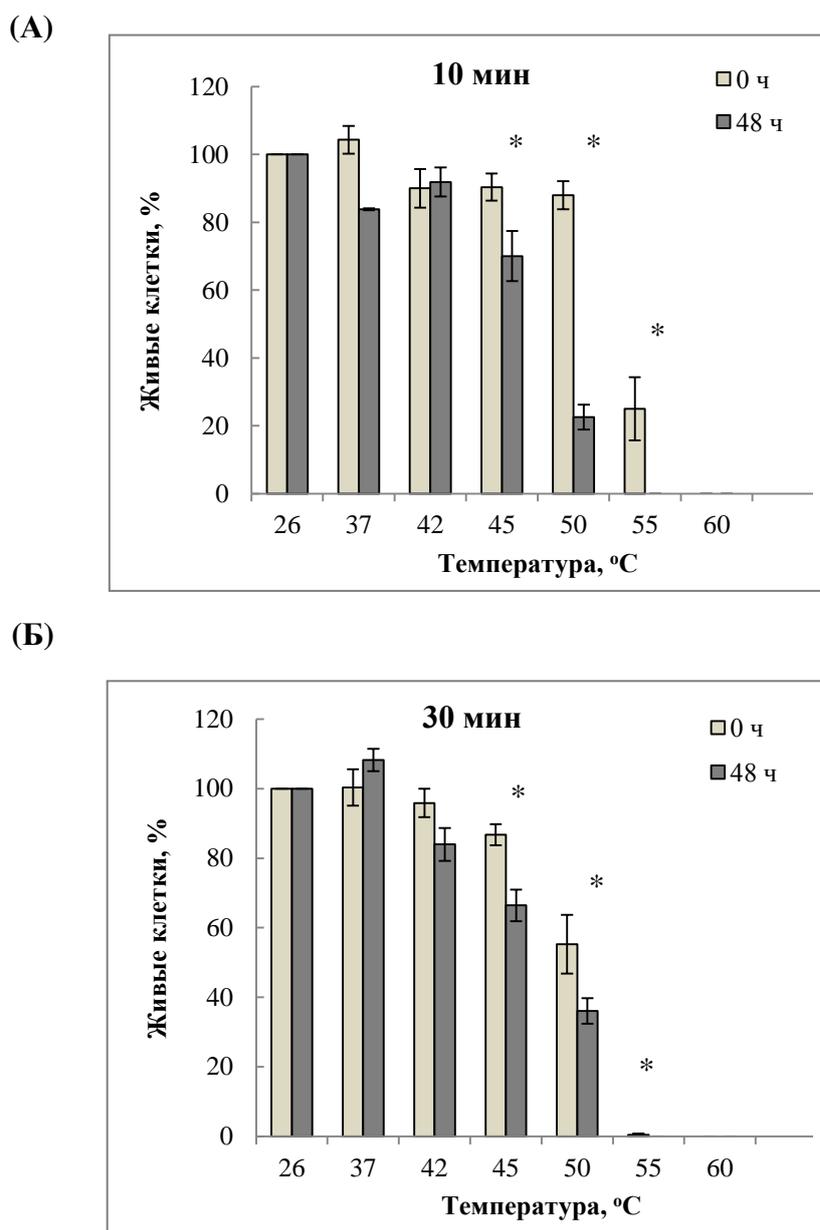
(А) микрофотографии клеток после воздействия при указанных температурах в течение 30 мин. (Б) количественная оценка живых клеток. Культуру клеток озимой пшеницы обрабатывали при указанных температурах в течение 10 и 30 мин. Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ) (зеленый канал), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ) (красный канал). За 100% принимали количество живых клеток контрольной культуры при 26 °C (для 10 и 30 мин). СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

температуры от 37 до 45 °С в течение 10 и 30 мин не приводит к гибели клеток сразу после воздействия (рис. 11). Инкубация при более высоких температурах (55 и 60 °С) сразу приводит к частичной или полной гибели клеток культуры озимой пшеницы.

Известно, что в ряде случаев клетки растений могут оставаться живыми сразу же после теплового шока, а погибать только через некоторое время [Locato et al., 2008]. Поэтому проанализировали жизнеспособность после воздействия аналогичных температурных обработок через 48 ч инкубации в контрольных условиях при 26 °С.

Как показано на рис. 12 А и Б, количество живых клеток озимой пшеницы, определяемое сразу же после теплового воздействия 37 и 42 °С и после восстановительного периода (26 °С, 48 ч), различалось незначительно. В культуре, инкубированной при температуре 45 °С (10 и 30 мин), после 48 ч инкубации при 26 °С жизнеспособность снижалась приблизительно на 10%. В суспензии клеток, обработанной при температуре 50 °С (10 мин), наблюдалось развитие отсроченной гибели. Сразу же после воздействия практически все клетки были живыми, а после восстановительного периода погибало около 70% клеток (рис. 12 А). В культуре клеток, инкубированной при температуре 50 °С (30 мин), сразу же после воздействия число живых клеток снижалось на 40%, а после восстановительного периода погибало еще 20% клеток (рис. 12 Б). В культуре, обработанной при температуре 55 °С (10 мин), сразу после воздействия 20% клеток оставались живыми, но все из них отсрочено погибали во время периода восстановления (рис. 12 А). Таким образом, при воздействии температурами 45 и 50 °С в течение 10 и 30 мин гибель клеток озимой пшеницы развивается во времени, что указывает на активный характер процесса.

Развитие во времени может свидетельствовать о развитии программируемой клеточной гибели (ПКГ) [Reape et al., 2008; Locato et al., 2008]. Одним из признаков ПКГ является появление с течением времени доли клеток с конденсированным протопластом [Reape et al., 2008]. Поэтому



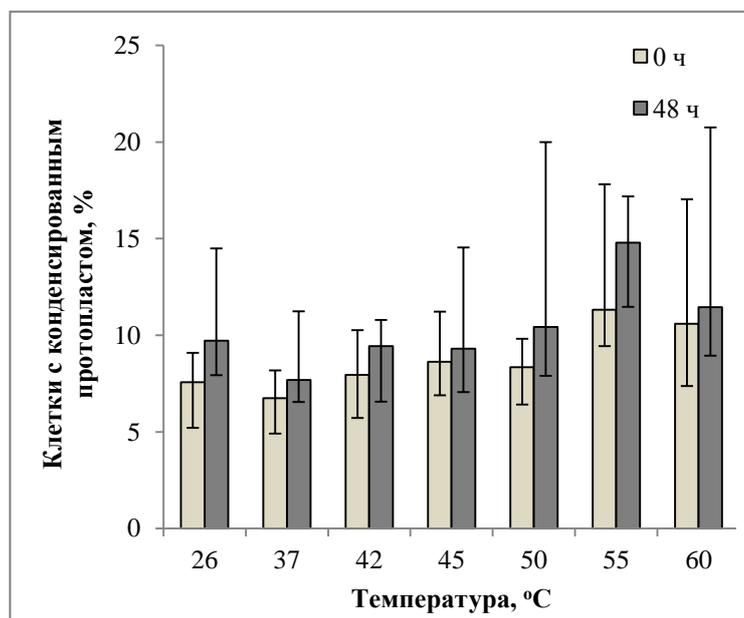
**Рис. 12.** Жизнеспособность клеток культуры *T. aestivum* сразу и через 48 ч после теплового воздействия различной интенсивности.

(А) культура клеток, обработанная в течение 10 мин. (Б) культура клеток, обработанная в течение 30 мин. Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ) (зеленый канал), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ) (красный канал). Жизнеспособность определяли сразу и через 48 ч после теплового воздействия. За 100% принимали количество живых клеток контрольной культуры при 26 °C (для 0 и 48 ч).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

(А)



(Б)



**Рис. 13.** Влияние теплового воздействия на конденсацию протопласта клеток культуры *T. aestivum* после теплового воздействия различной интенсивности.

(А) микрофотографии живых и мертвых клеток с конденсированным протопластом после воздействия температуры 55 °C в течение 10 мин. (Б) количественная оценка клеток с конденсированным протопластом. Конденсацию оценивали сразу и через 48 ч после теплового воздействия в течение 30 мин. За 100% принимали общее количество клеток контрольной культуры при 26 °C (для 0 и 48 ч). Масштабный отрезок – 10 мкм. n=3. M±S.E.

необходимо было оценить долю клеток озимой пшеницы с конденсированным протопластом сразу после воздействия и после периода восстановления.

Изучение морфологии клеток сразу после воздействия и после восстановительного периода показало, что, как правило, увеличения доли клеток с конденсированным протопластом не происходило (рис. 13). Таким образом, тепловое воздействие при температурах 45, 50 °С приводит к отсроченной гибели клеток озимой пшеницы, однако увеличения доли клеток с конденсированным протопластом не наблюдалось.

### *3.1.6.2. Жизнеспособность клеток культуры сахарного тростника в зависимости от интенсивности теплового воздействия*

При определении жизнеспособности клеток сахарного тростника после теплового воздействия различной интенсивности (37, 42, 45, 50, 55 и 60 °С в течение 10 и 30 мин) также использовали флуоресцентные красители FDA и PI (рис. 14 А). Полученные результаты сходны с данными, полученными при оценке влияния теплового воздействия на жизнеспособность клеток озимой пшеницы (рис. 11 Б).

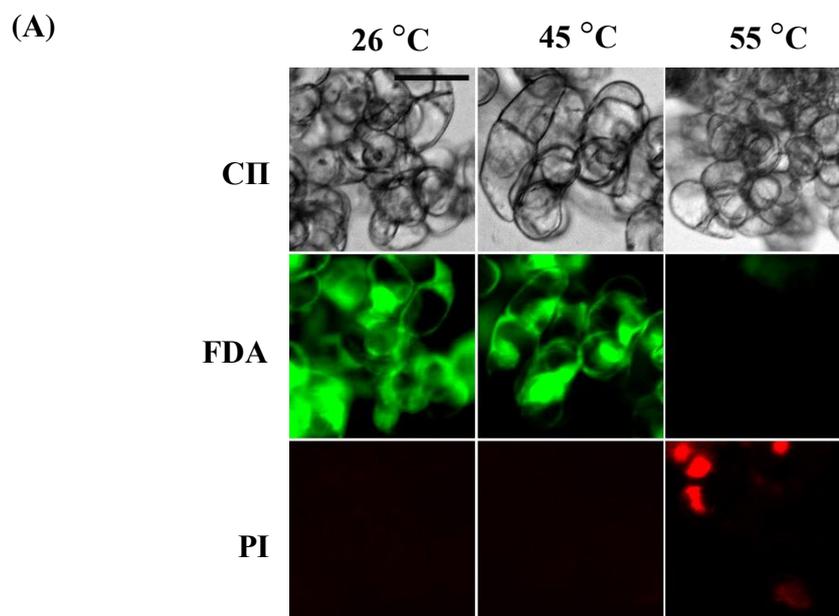
В первой серии экспериментов определение жизнеспособности проводили сразу после воздействия. Тепловое воздействие в диапазоне от 37 до 50 °С не влияло на жизнеспособность клеток культуры сахарного тростника (рис. 14 Б). Воздействие при температуре 55 °С в течение 10 и 30 мин приводило к гибели примерно 65% клеток. Полная гибель клеток наблюдалась при тепловом воздействии 60 °С (рис. 14 Б).

Изучение динамики гибели клеток сахарного тростника показало, что обработка при 45 °С (10 и 30 мин) не имеет отрицательного влияния на жизнеспособность сразу же после воздействия, но после 48 ч инкубации при 26 °С количество живых клеток снижалось примерно на 20% (рис. 15). Более сильное тепловое воздействие при 50 °С в течение 10 и 30 мин приводило к отсроченной гибели порядка 40–60% клеток.

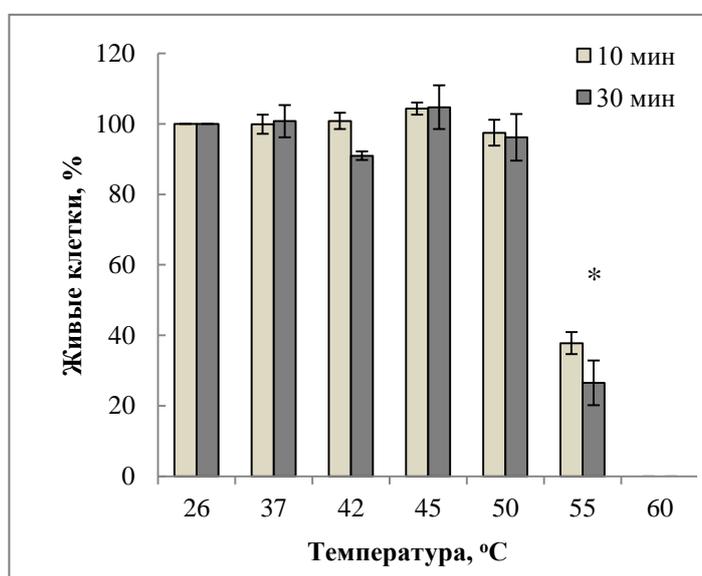
На следующем этапе оценили долю клеток с конденсированным протопластом при данных температурных обработках (рис. 16). Как показано на рис. 16, доля клеток с конденсированным протопластом в культуре клеток тростника увеличивалась примерно в 4 раза при воздействии 45 °С, в 15 раз – при 50 °С, в 23 раза – при 55 °С.

Таким образом, обработка повышенными температурами в диапазоне от 45 до 50 °С не влияет на жизнеспособность клеток сахарного тростника, если измерение жизнеспособности проводили сразу после воздействия. Более жесткое тепловое воздействие (55 и 60 °С) вызывает мгновенную гибель клеток. В то же время тепловое воздействие при 45 и 50 °С (30 мин) приводит к отсроченной гибели клеток, которая сопровождается конденсацией протопласта.

Следует отметить, что динамика снижения жизнеспособности в культуре клеток озимой пшеницы и сахарного тростника имеет схожий характер. Однако наблюдаются некоторые важные отличия, которые указывают на различную устойчивость к действию высоких температур у изучаемых культур клеток. При тепловом воздействии 55 °С в течение 30 мин практически все клетки пшеницы погибают (рис. 11 Б), однако примерно 20% клеток тростника остаются живыми (рис. 14 Б). Это указывает на то, что клетки сахарного тростника более устойчивы к тепловому воздействию.

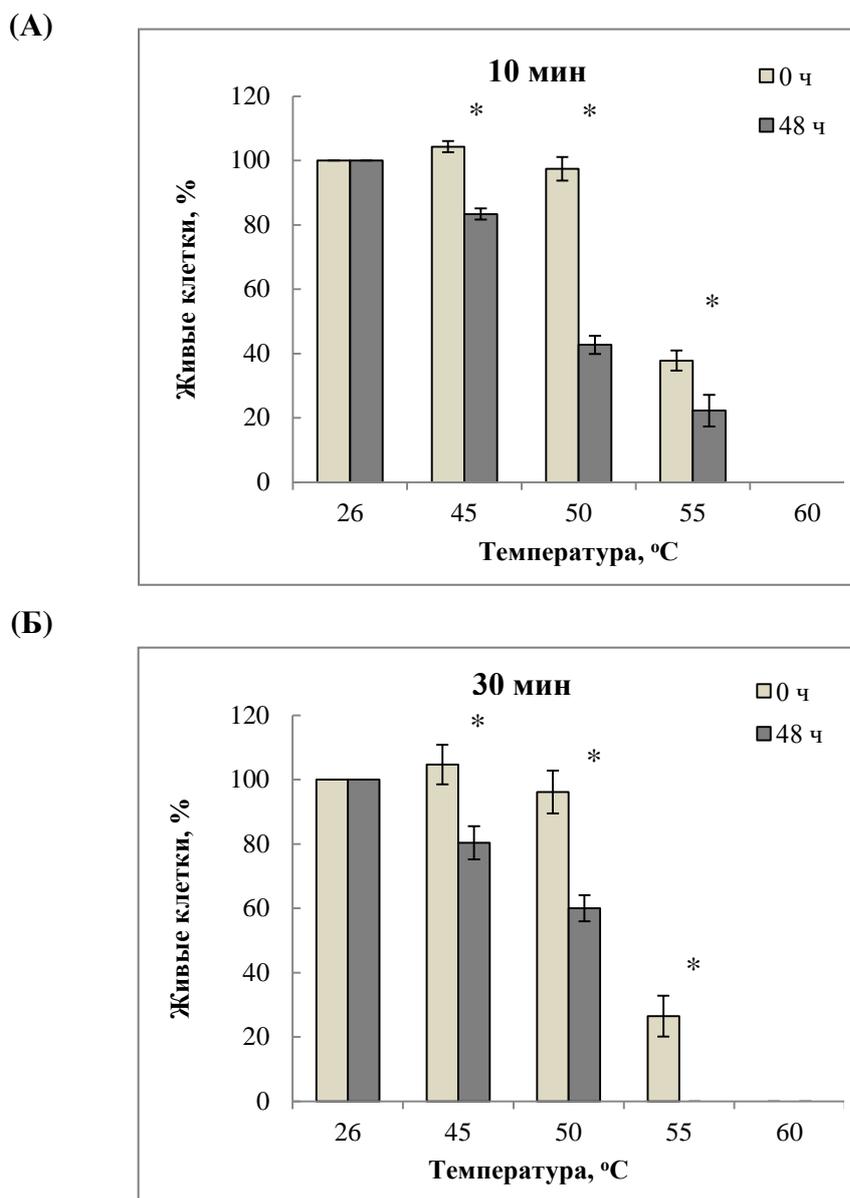


(Б)



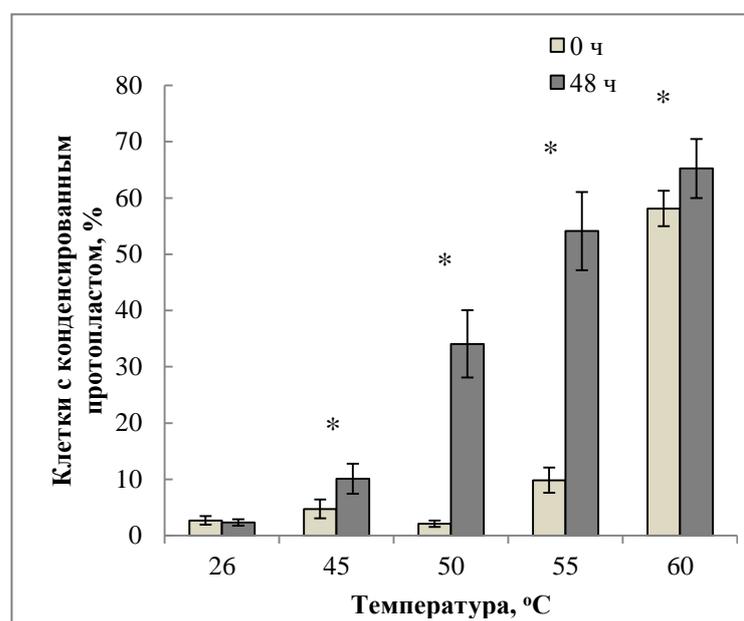
**Рис. 14.** Жизнеспособность клеток культуры *S. officinarum* сразу после теплового воздействия различной интенсивности.

(А) микрофотографии клеток после воздействия при указанных температурах в течение 30 мин. (Б) количественный обсчет живых клеток. Культуру клеток сахарного тростника инкубировали при указанных температурах в течение 10 и 30 мин. Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ) (зеленый канал), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ) (красный канал). За 100% принимали количество живых клеток контрольной культуры при 26 °C (для 10 и 30 мин). СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. М±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 15.** Жизнеспособность клеток культуры *S. officinarum* сразу и через 48 ч после теплового воздействия различной интенсивности.

(А) культура клеток, инкубированная при тепловых воздействиях в течение 10 мин. (Б) культура клеток, инкубированная при тепловых воздействиях в течение 30 мин. Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ) (зеленый канал), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ) (красный канал). Жизнеспособность определяли сразу и через 48 ч после теплового воздействия. За 100% принимали количество живых клеток контрольной культуры при 26 °C (для 0 и 48 ч). Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



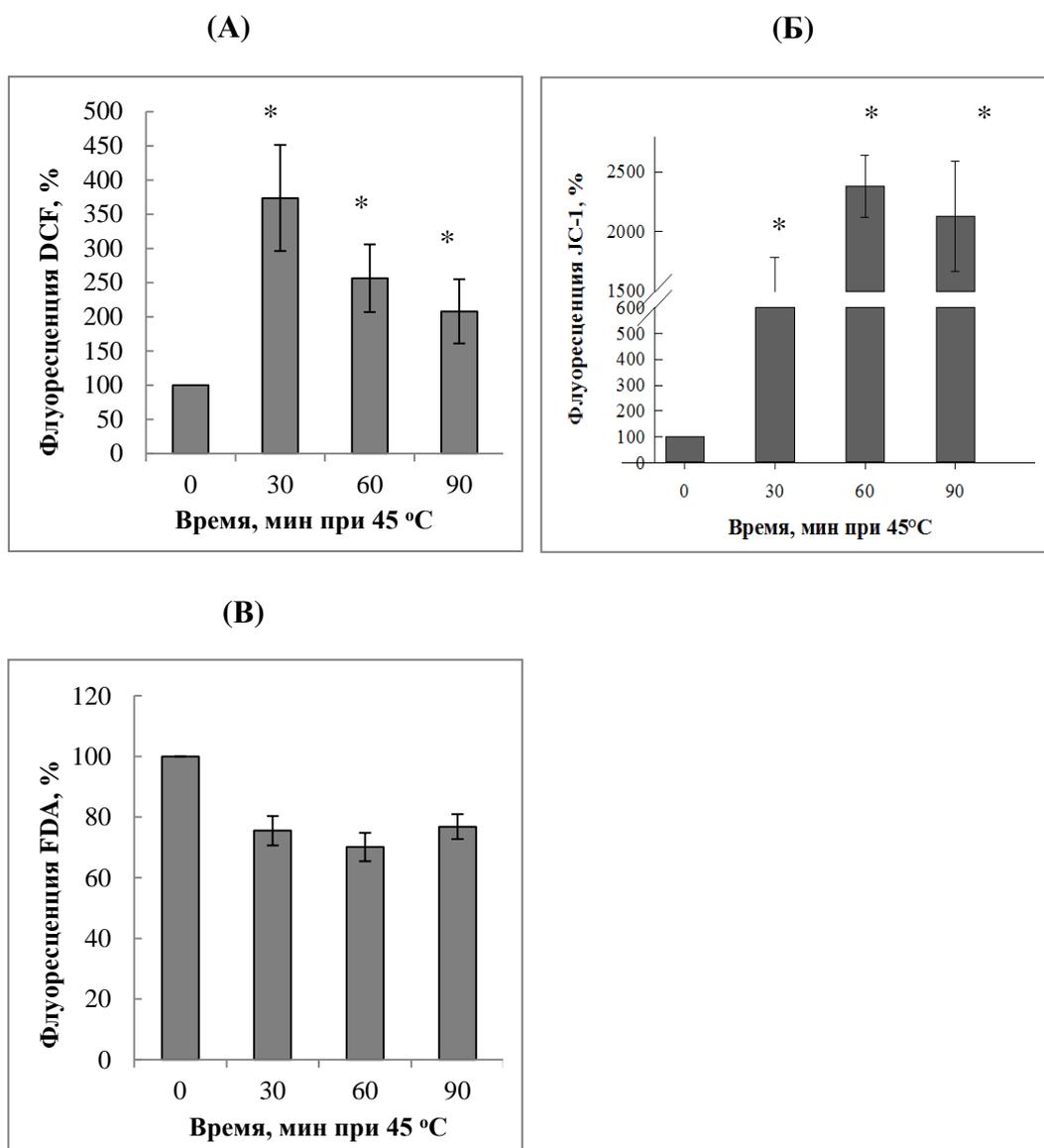
**Рис. 16.** Влияние теплового воздействия на конденсацию протопласта клеток культуры *S. officinarum* после теплового воздействия различной интенсивности. (А) микрофотографии живых и мертвых клеток с конденсированным протопластом после воздействия температуры 55 °C в течение 10 мин. (Б) количественная оценка клеток с конденсированным протопластом. Конденсацию оценивали сразу и через 48 ч после теплового воздействия в течение 30 мин. За 100% принимали общее количество клеток контрольной культуры при 26 °C (для 0 и 48 ч). Масштабный отрезок – 10 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### ***3.1.7. Изменения продукции активных форм кислорода, митохондриального потенциала и жизнеспособности культуры клеток озимой пшеницы в зависимости от продолжительности теплового воздействия 45 °С***

Максимальное увеличение содержания АФК (рис. 3 А) и максимальная гиперполяризация митохондриальной мембраны у клеток озимой пшеницы наблюдаются при тепловом воздействии 45 °С (рис. 6 А). Необходимо было установить зависимость между изменениями АФК, МП и жизнеспособностью клеток культуры от продолжительности теплового воздействия при данной температуре.

Клетки озимой пшеницы инкубировали при температуре 45 °С в течение 0–90 мин и измеряли указанные выше параметры. Было выявлено, что максимальный уровень АФК наблюдался после 30 мин тепловой обработки (рис. 17 А). При более длительной инкубации (60–90 мин) происходило снижение уровня АФК, которое, однако, не достигало контрольного уровня. Как показано на рис. 17 Б, максимальное увеличение МП наблюдалось после 60–90 мин тепловой обработки. Флуоресценция FDA не менялась существенно во время теплового воздействия (рис. 17 В).

Таким образом, температура воздействия 45 °С в течение 0–90 мин не влияет отрицательно на жизнеспособность клеток озимой пшеницы. Флуоресценция FDA существенно не меняется в течение всего эксперимента. В то же время происходит повышение генерации АФК и увеличение МП, но эти изменения не являются синхронными.



**Рис. 17.** Временная динамика изменения интенсивности флуоресценции DCF, JC-1, FDA в клетках культуры *T. aestivum* при тепловом воздействии 45 °С. Культуру клеток обрабатывали при 45 °С в течение 0–90 мин.

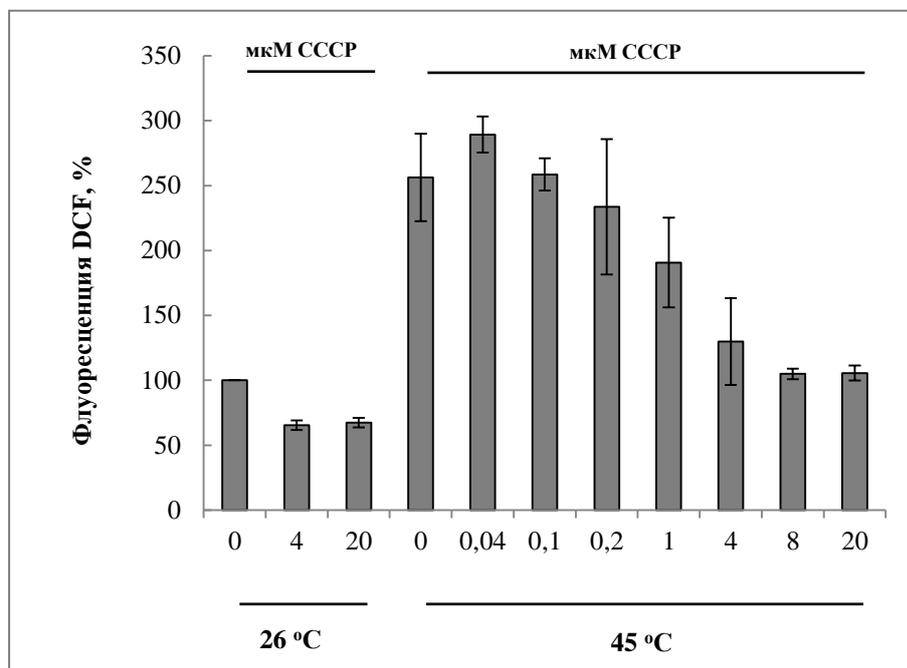
(А) – интенсивность флуоресценции DCF (зеленый канал). (Б) – интенсивность флуоресценции JC-1 (красный канал). (В) – интенсивность флуоресценции FDA (зеленый канал). Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С («0»).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### ***3.1.8. Влияние протонофора СССР на продукцию АФК при тепловом воздействии у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы***

Увеличение содержания АФК и МП имеет сходную тенденцию в клетках озимой пшеницы после 10 и 30 мин теплового воздействия (рис. 8). С целью выяснения причинно-следственной связи между повышением МП и АФК в клетках озимой пшеницы при действии повышенных температур эксперименты были проведены в присутствии протонофора СССР в тех же условиях.

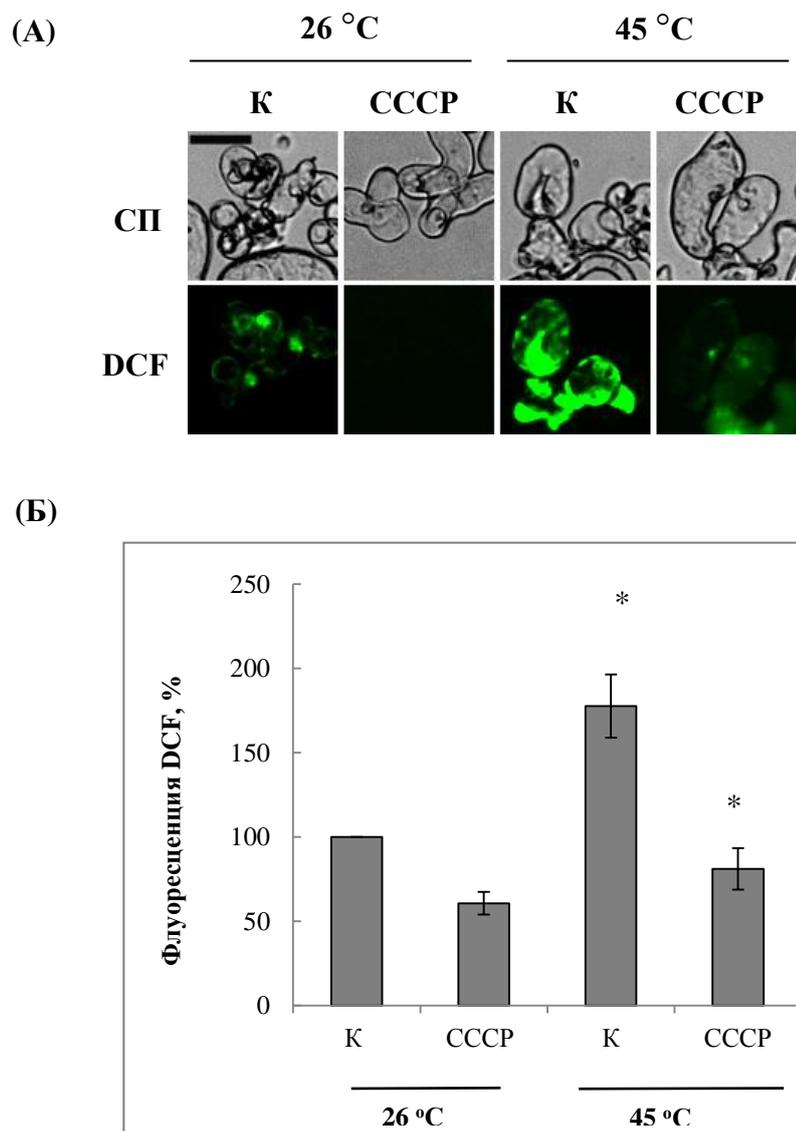
На первом этапе необходимо было установить концентрацию СССР, эффективно действующую на изучаемые параметры. Для этого культуру клеток озимой пшеницы обрабатывали при температуре 45 °С в течение 10 мин с добавлением или без добавления СССР (рис. 18). Предварительный эксперимент показал, что низкие концентрации СССР (0,04–1 мкМ) не приводили к снижению содержания АФК. Более высокие концентрации (4–20 мкМ) понижали содержание АФК до контрольного уровня. Следовательно, снижение продукции АФК при тепловом воздействии на клетки зависит от используемой концентрации СССР. Концентрация 4 мкМ СССР является самой низкой, которая эффективно понижает продукцию АФК.

На следующем этапе необходимо было более подробно изучить изменение содержания АФК в клетках культуры озимой пшеницы при инкубации с 4 мкМ СССР и воздействии температуры 45 °С в течение 30 мин. Как показано на рис. 19, тепловое воздействие вызывало усиление продукции АФК, а добавление СССР ингибировало этот процесс. Аналогичным образом СССР подавлял образование АФК в контрольных условиях (рис. 19). Таким образом, протонофор СССР, снижая митохондриальный потенциал, подавляет продукцию АФК при тепловом воздействии.



**Рис. 18.** Эффект различных концентраций CCCP (0,04; 0,1; 0,2; 1; 4; 8 и 20 мкМ) на изменение содержания АФК в культуре клеток *T. aestivum* при тепловом воздействии.

Культуру клеток обрабатывали при 45 °С в течение 10 мин и проводили измерение флуоресценции DCF. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции. За 100% принимали флуоресценцию контрольной культуры при 26 °С. M±S.E.



**Рис. 19.** Эффект СССР на содержание АФК в культуре клеток озимой пшеницы при тепловом воздействии.

(А) – микрофотографии клеток с флуоресценцией DCF при воздействии температуры 45 °С в течение 30 мин. (Б) – представлен количественный анализ флуоресценции DCF при воздействии температуры 45 °С в течение 30 мин. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С. К – интенсивность флуоресценции в отсутствие СССР; СССР – интенсивность флуоресценции в присутствии 4 мкМ СССР.

Флуоресценцию DCF (зеленый канал) измеряли сразу же после теплового воздействия. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

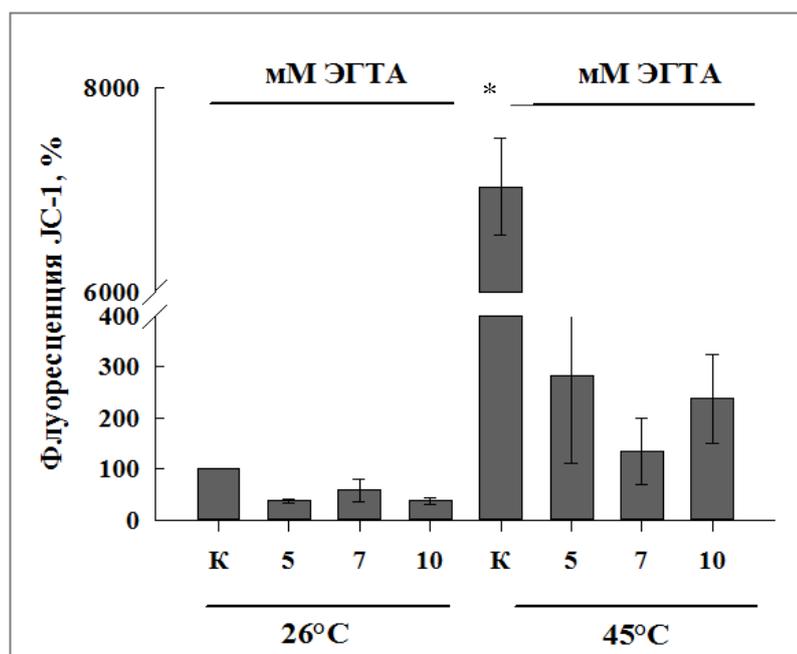
### ***3.1.9. Эффект хелатора кальция и ингибитора кальциевых каналов на изменение потенциала на внутренней мембране митохондрий и содержания АФК в культуре клеток озимой пшеницы***

Известно, что одним из сигналов, приводящих к увеличению содержания АФК, является повышение ионов кальция в цитозоле [Гордеева и др., 2003; Jacoby et al., 2012]. Ранее было показано, что в клетках растений уровень кальция в цитозоле повышается при тепловом воздействии [Saidi et al., 2011; Mittler et al., 2012; Horvath et al., 2012]. Также в ряде случаев наблюдается связь между повышением уровня цитозольного кальция и гиперполяризацией митохондриальной мембраны [Pozniakovsky et al., 2005; Balogh et al., 2005; Sun et al., 2012]. Поэтому необходимо было изучить влияние хелатора кальция – ЭГТА и блокатора кальциевых каналов хлорида лантана –  $\text{LaCl}_3$  на повышение МП и содержания АФК в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии.

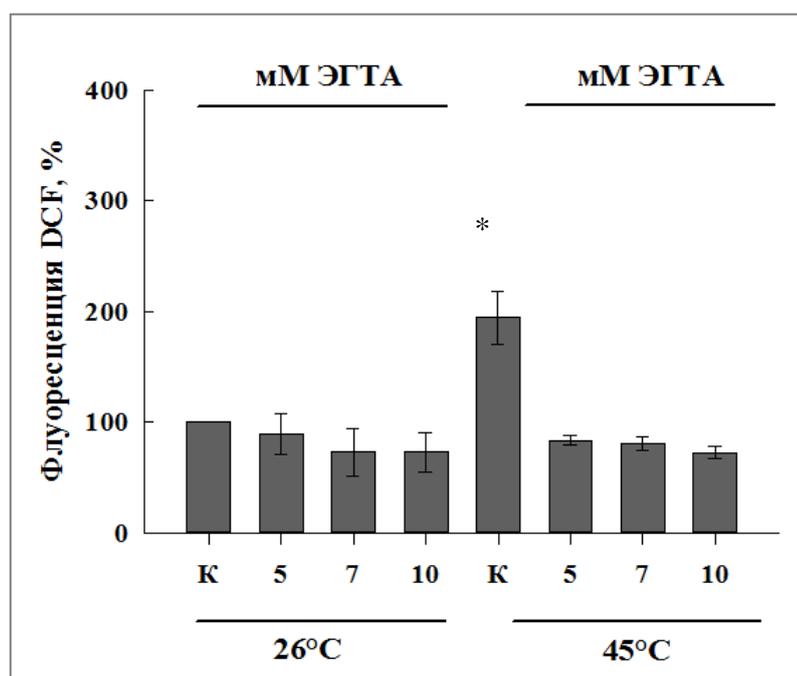
В соответствии с ранее полученными результатами (рис. 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 17, 18, 19) тепловое воздействие  $45\text{ }^\circ\text{C}$  приводило к увеличению МП и усилению продукции АФК в клетках пшеницы. Инкубация клеток в присутствии ЭГТА в концентрациях 5, 7, 10 мМ подавляла повышение МП при тепловом воздействии  $45\text{ }^\circ\text{C}$  (рис. 20 А). Подобный эффект был получен и при изучении влияния  $\text{LaCl}_3$  на изменение МП (рис. 21 А). Как показано на рис. 21 А,  $\text{LaCl}_3$  в концентрации 5, 10, 15 мМ эффективно подавлял повышение МП, индуцированное тепловым воздействием.

Аналогичный эффект ЭГТА и  $\text{LaCl}_3$  наблюдался на продукцию АФК. Тепловое воздействие вызывало резкое повышение содержания АФК, но добавление ЭГТА эффективно подавляло это повышение. Продукция АФК в присутствии ЭГТА снижалась в два раза и достигала контрольного уровня (рис. 20 Б). Блокатор кальциевых каналов –  $\text{LaCl}_3$  также подавлял продукцию АФК при тепловом воздействии (рис. 21 Б).

(А)



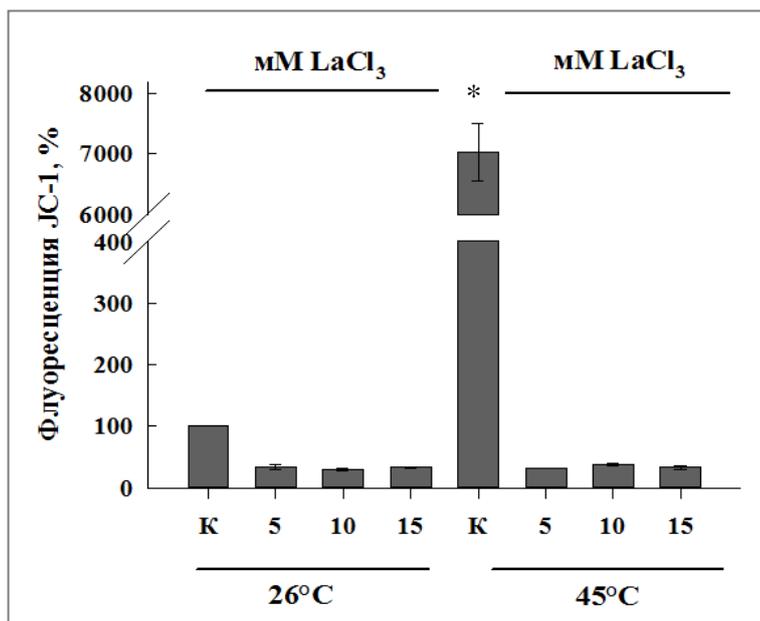
(Б)



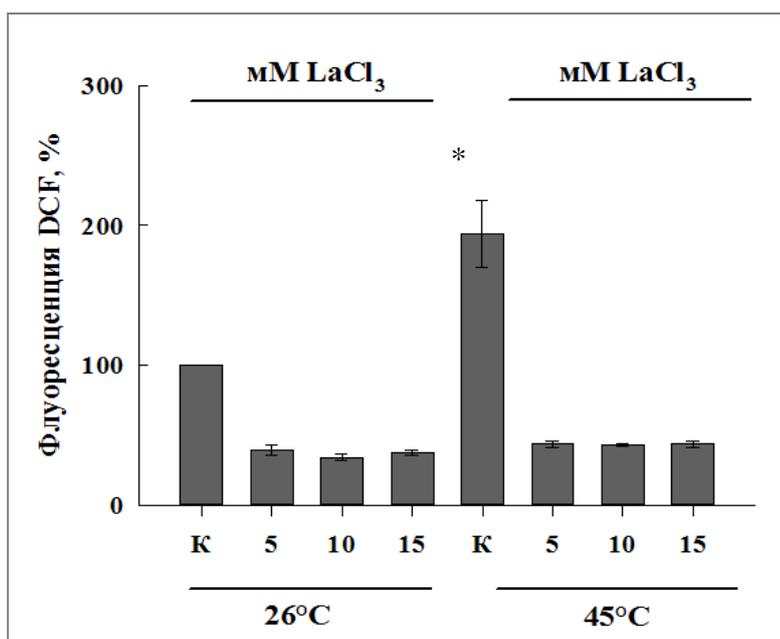
**Рис. 20.** Эффект ЭГТА на митохондриальный потенциал и продукцию АФК в культуре клеток озимой пшеницы при тепловом шоке.

Культуру клеток обрабатывали при 45 °С в течение 30 мин в присутствии ЭГТА (5, 7, 10 мМ) и измеряли флуоресценцию JC-1 (красный канал), DCF (зеленый канал) сразу же после воздействия. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 (А) и DCF (Б). За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С. n=3. М±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

(А)



(Б)



**Рис. 21.** Эффект LaCl<sub>3</sub> на митохондриальный потенциал и продукцию АФК в культуре клеток озимой пшеницы.

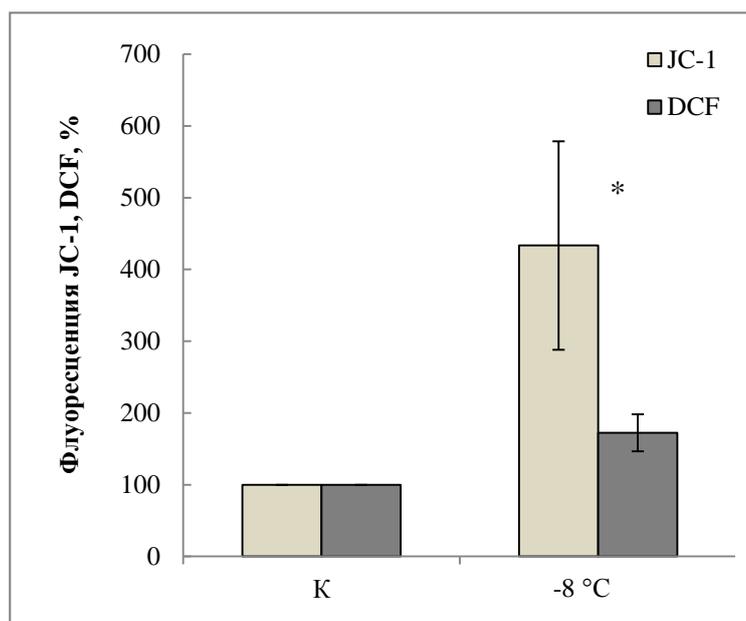
Культуру клеток обрабатывали при 45 °С в течение 30 мин в присутствии LaCl<sub>3</sub> (5, 10, 15 мМ). Флуоресценцию красителей JC-1 (красный канал) и DCF (зеленый канал) измеряли сразу же после воздействия. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 (А) и DCF (Б). За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °С. n=3. М±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости p≤0,05.

Таким образом, действие ЭГТА и  $\text{LaCl}_3$  на клетки озимой пшеницы при тепловом воздействии приводит к снижению гиперполяризации митохондриальной мембраны и подавлению повышения уровня АФК. Полученные результаты подтверждают связь между повышением содержания АФК и гиперполяризацией митохондриальной мембраны при тепловом воздействии и указывают, что повышение АФК и увеличение значения МП при тепловом воздействии зависит от уровня цитозольного кальция.

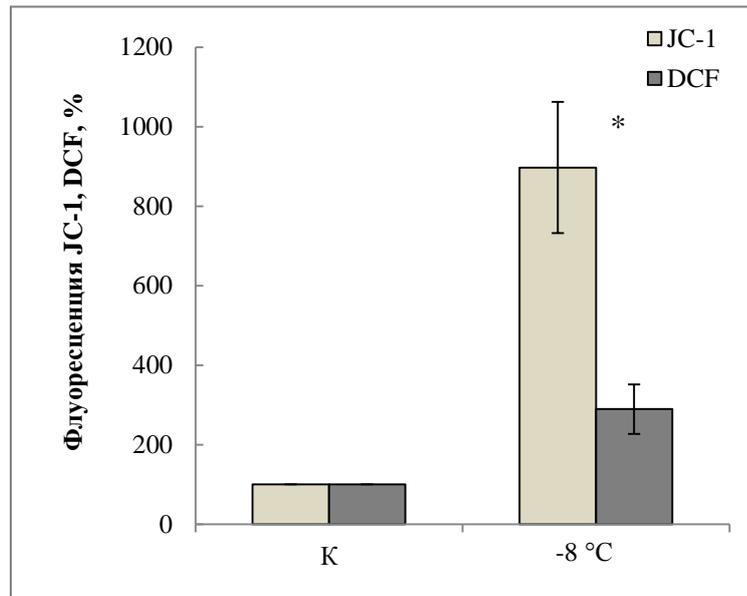
### ***3.1.10. Изменение митохондриального потенциала и уровня АФК при холодовом воздействии в культурах клеток озимой пшеницы и сахарного тростника***

Показано, что холодовое воздействие вызывает повышение уровня АФК в клетках арабидопсиса [Zhou et al., 2012]. Ранее в лаборатории было показано, что повышение генерации АФК происходило при холодовом воздействии в клетках озимой пшеницы [Lyubushkina et al., 2014]. Поскольку при тепловом воздействии наблюдалось повышение АФК и МП, то необходимо было изучить, будут ли происходить подобные явления при холодовом воздействии. Как показано на рис. 22, при холодовом воздействии  $-8\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 ч в клетках культуры озимой пшеницы наблюдалось повышение значения МП и увеличение АФК. Холодовое воздействие ( $-8\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 2 ч) на культуру клеток сахарного тростника выявило сходную тенденцию и сопровождалось повышением МП и уровня АФК (рис. 23).

Таким образом, повышение потенциала на внутренней мембране митохондрий и уровня АФК происходит при действии на клетки низких температур, что является свидетельством того, что данная реакция является универсальным ответом клетки на температурный стресс.



**Рис. 22.** Изменение уровня митохондриального потенциала и содержания АФК при холодном воздействии ( $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 ч) в клетках культуры озимой пшеницы. Флуоресценцию красителей JC-1 (красный канал) и DCF (зеленый канал) измеряли сразу же после воздействия. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (К).  $n=3$ .  $M\pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p\leq 0,05$ .



**Рис. 23.** Изменение уровня митохондриального потенциала и содержания АФК при холодном воздействии ( $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 ч) в клетках культуры сахарного тростника.

Флуоресценцию красителей JC-1 (красный канал) и DCF (зеленый канал) измеряли сразу же после воздействия. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF. За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (К).  $n=3$ .  $M\pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p\leq 0,05$ .

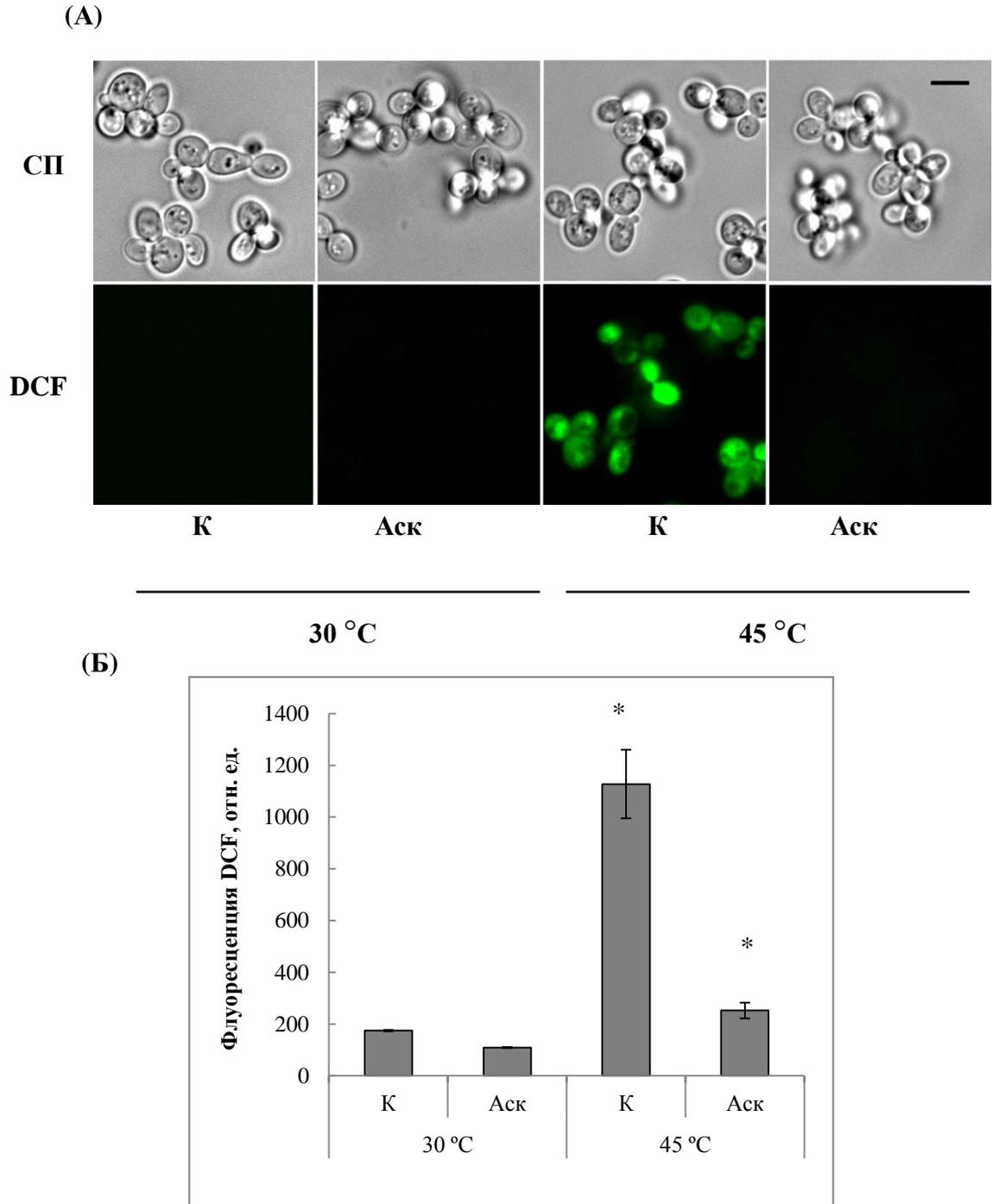
### **3.2. Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток дрожжей**

Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для исследования клеточных процессов, а также ответа клетки на действие стресса. Использование в работе легко размножающихся клеток дрожжей, время удвоения клеток которых значительно меньше времени удвоения клеток высших эукариот, обуславливает простоту их культивирования. Также для клеток дрожжей можно быстрее получить различные мутанты. В данной работе использовалась мутация *petite*. В клетках мутанта *petite* в результате утраты митохондриальной ДНК (мтДНК) не функционирует электрон-транспортная цепь [Tzagoloff et al., 1986], тем самым нарушено нормальное функционирование митохондрий. Необходимо было оценить изменение содержания АФК, значения МП и жизнеспособность клеток дрожжей при тепловом воздействии.

#### ***3.2.1. Изучение изменения содержания АФК, потенциала на внутренней мембране митохондрий и жизнеспособности клеток Saccharomyces cerevisiae при тепловом воздействии. Эффект аскорбиновой кислоты на изменение данных процессов***

Известно, что тепловой шок приводит к повышению продукции АФК в клетках дрожжей [Davidson et al., 1996; Sugiyama et al., 2000; Cao et al., 2013; Федосеева и др., 2014]. Избыточное накопление уровня АФК вызывает развитие окислительного стресса, который может вызывать гибель клетки. Следующей задачей было изучение изменения продукции АФК, МП и жизнеспособности клеток дрожжей при тепловом воздействии. Клетки дрожжей штамма родительского типа W303–1В подвергали тепловому воздействию (45 °С в течение 30 мин) и анализировали изменение изучаемых параметров.

Для определения содержания АФК использовали флуоресцентный краситель DCF (рис. 24 А). В контрольных клетках уровень АФК был



**Рис. 24.** Эффект аскорбиновой кислоты на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С (30 мин).

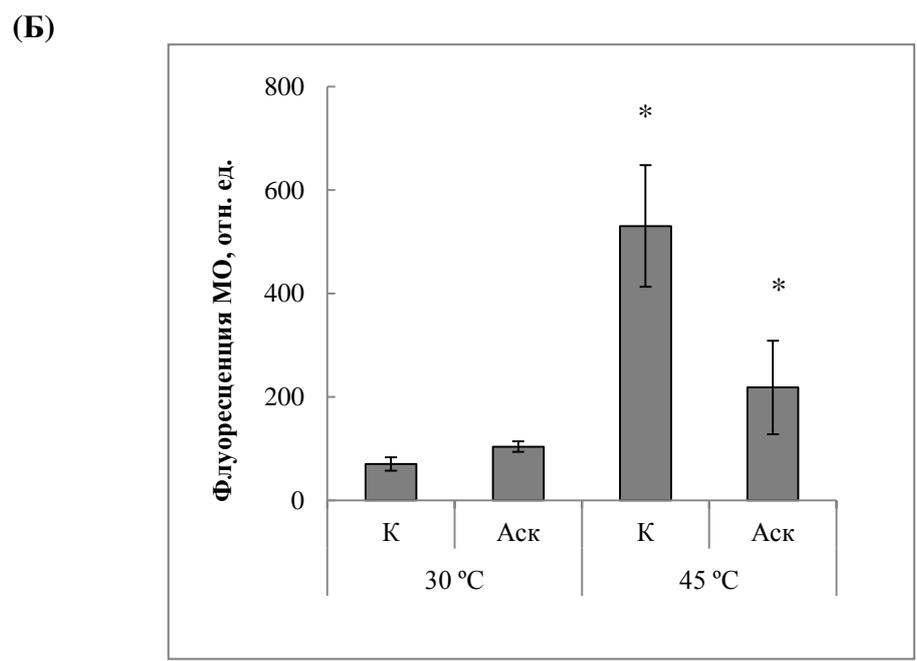
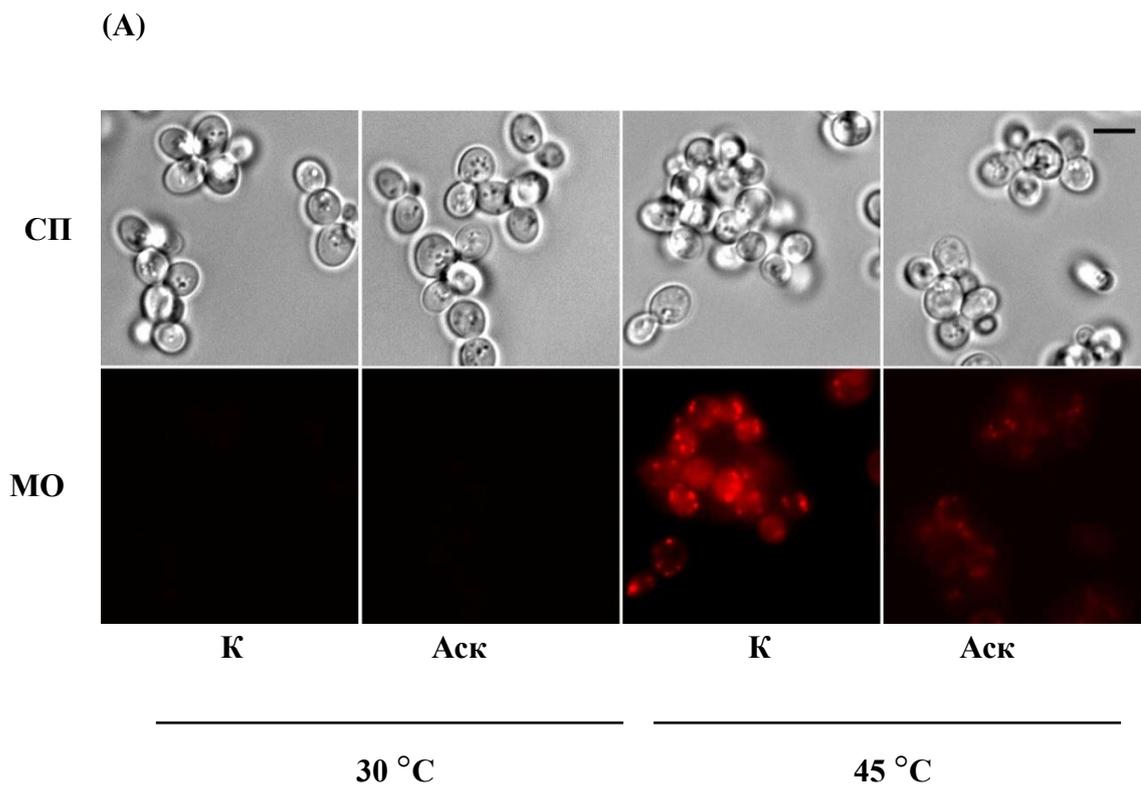
(А) – микрофотографии клеток дрожжей. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции DCF. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °С в отсутствие 10 мМ аскорбиновой кислоты. Аск – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °С в присутствии 10 мМ аскорбиновой кислоты. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

незначительным (рис. 24 А, Б). Тепловое воздействие (45 °С в течение 30 мин) приводило к увеличению генерации АФК. Добавление антиоксиданта – аскорбиновой кислоты к клеткам, инкубируемым в контрольных условиях, не влияло на содержание АФК. Однако аскорбиновая кислота эффективно подавляла повышение образования АФК при тепловом воздействии (рис. 2 А и Б). Полученные на клетках дрожжей данные о повышении генерации АФК при тепловом воздействии согласуются с результатами, полученными на культурах клеток растений (рис. 2 и 3). Увеличение содержания АФК происходит при тепловом воздействии как в клетках дрожжей, так и в клетках растений.

Известно, что умеренное, не приводящее к гибели клеток, тепловое воздействие повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках животных [Balogh et al., 2005], растений [Rikhvanov et al., 2007; Пятрикас и др., 2014] и дрожжей [Rikhvanov et al., 2005; Федосеева и др., 2012]. Необходимо было выяснить, наблюдается ли зависимость между повышением МП и усилением генерации АФК в клетках дрожжей. Для этого использовали флуоресцентный краситель MitoTracker Orange (МО), который специфично отображает изменение МП. Как видно из рис. 25, в клетках дрожжей, инкубируемых при 30 °С, потенциал практически не детектировался. Тепловое воздействие приводило к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны (рис. 25 А, Б). Аскорбиновая кислота в клетках, инкубированных при температуре 45 °С, снижала повышение МП в отличие от клеток, инкубируемых в контрольных условиях.

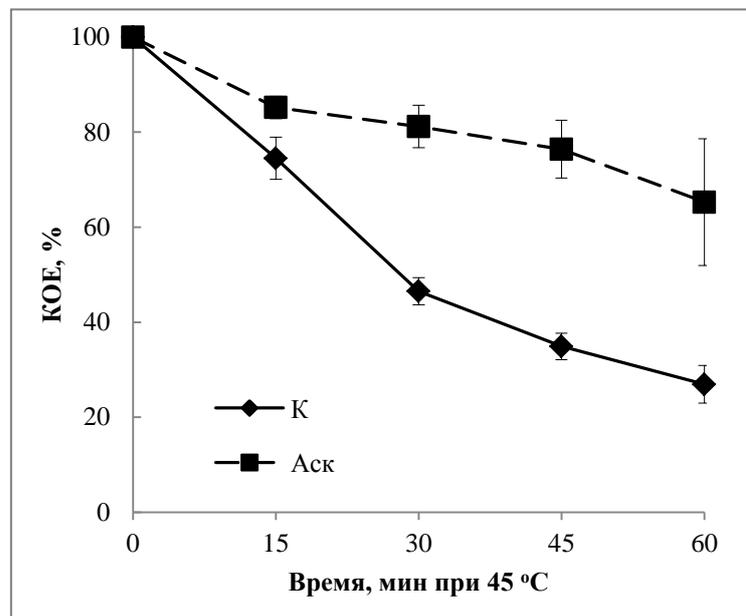
Согласно данным, представленным на рис. 24 и 25, тепловое воздействие приводило к увеличению содержания АФК и повышению значения МП в клетках дрожжей.

В дальнейшем изучили влияние теплового воздействия на жизнеспособность клеток. Жизнеспособность оценивали, подсчитывая количество колониобразующих единиц (КОЕ). Тепловое воздействие (45 °С) приводило к значительной гибели клеток дрожжей, которое возрастало с



**Рис. 25.** Эффект аскорбиновой кислоты на изменение МП в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °C (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции МО. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °C в отсутствие 10 мМ аскорбиновой кислоты. Аск – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °C в присутствии 10 мМ аскорбиновой кислоты. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 26.** Эффект аскорбиновой кислоты на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С.

Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. Клетки инкубировали при 45 °С в отсутствие (К) и присутствии 10 мМ аскорбиновой кислоты (Аск).  $n=3$ .  $M \pm S.E.$

течением времени обработки. Добавление в среду инкубации аскорбиновой кислоты повышало устойчивость клеток к тепловому воздействию (рис. 26).

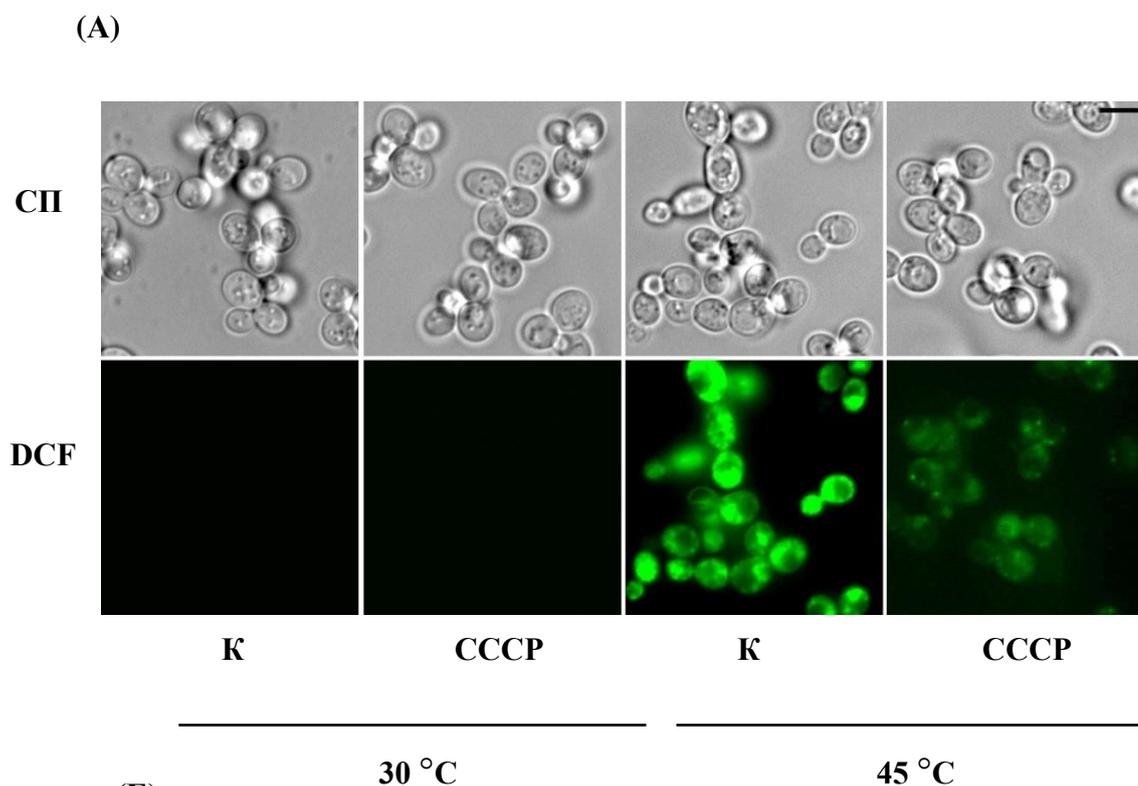
Таким образом, тепловое воздействие (45 °С, 30 мин) приводит к увеличению содержания АФК и повышению МП в клетках дрожжей. Поскольку аскорбиновая кислота подавляет генерацию АФК при тепловом воздействии и защищает клетки от гибели, полученные результаты четко указывают, что одной из основных причин гибели клеток при умеренном тепловом воздействии является повышение содержания АФК.

### ***3.2.2. Эффект протонофоров на снижение содержания АФК и повышение устойчивости к тепловому воздействию в клетках дрожжей***

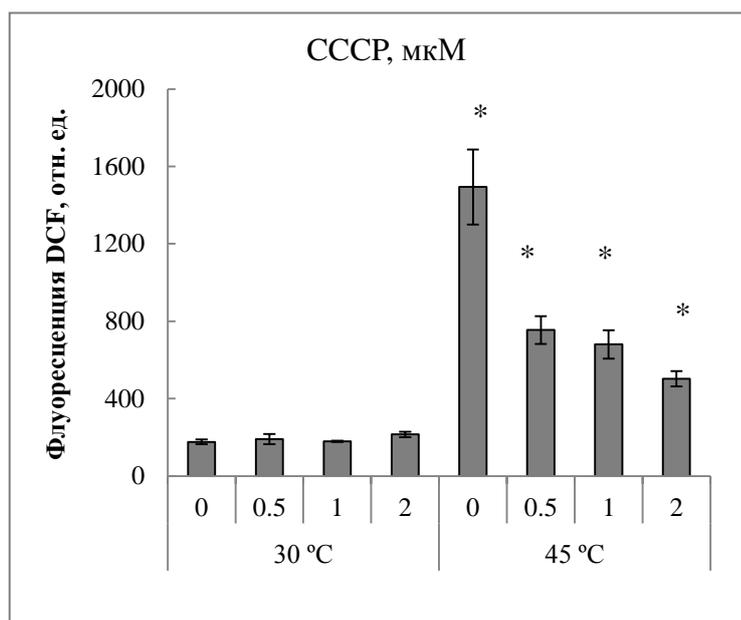
Из литературных данных известно, что протонофоры могут ингибировать продукцию АФК в изолированных митохондриях животных [Korshunov et al., 1997] и клетках дрожжей [Pozniakovsky et al., 2005; Pan et al., 2011]. На культуре клеток озимой пшеницы нами показано, что протонофор СССР подавляет повышение содержания АФК при тепловом воздействии (рис. 19) и митохондриальный потенциал (рис. 7). В связи с этим необходимо было оценить влияние протонофоров на содержание АФК, изменение МП и жизнеспособность клеток дрожжей при тепловом воздействии.

Как показано на рис. 27, протонофор СССР в различных концентрациях (0,5; 1; 2 мкМ) подавлял усиление генерации АФК при тепловом воздействии. Одновременно СССР подавлял МП (рис. 28 А, Б). Таким образом, так же как и в клетках растений СССР подавляет гиперполяризацию митохондриальной мембраны в клетках дрожжей при повышении температуры, и при этом наблюдается снижение образования АФК.

На следующем этапе необходимо было оценить влияние СССР на жизнеспособность клеток дрожжей при повышении температуры. Оказалось, что добавление СССР в низкой концентрации (0,5 мкМ) защищало клетки от гибели при тепловом воздействии 45 °С (рис. 29). Протекторного эффекта не

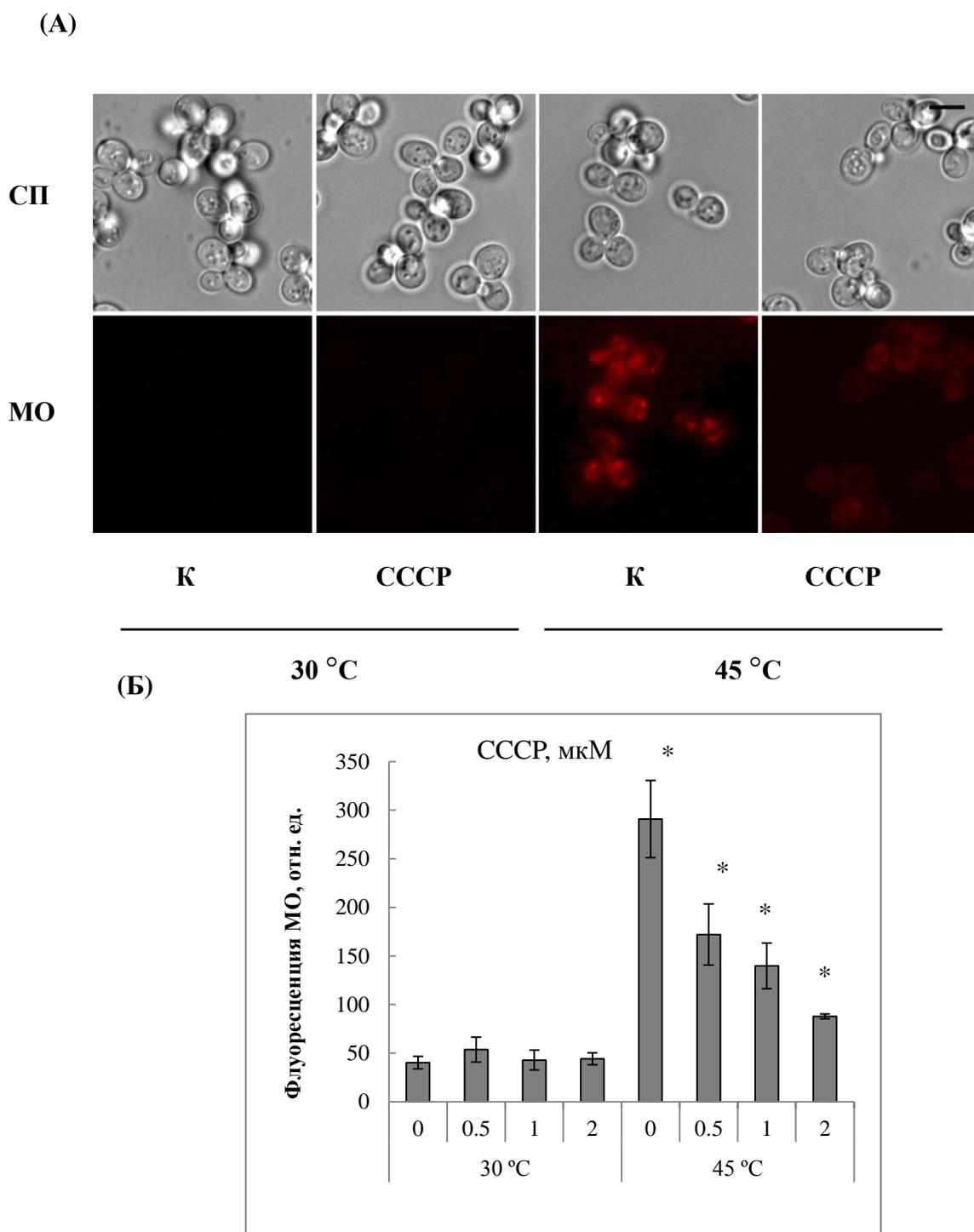


(Б)



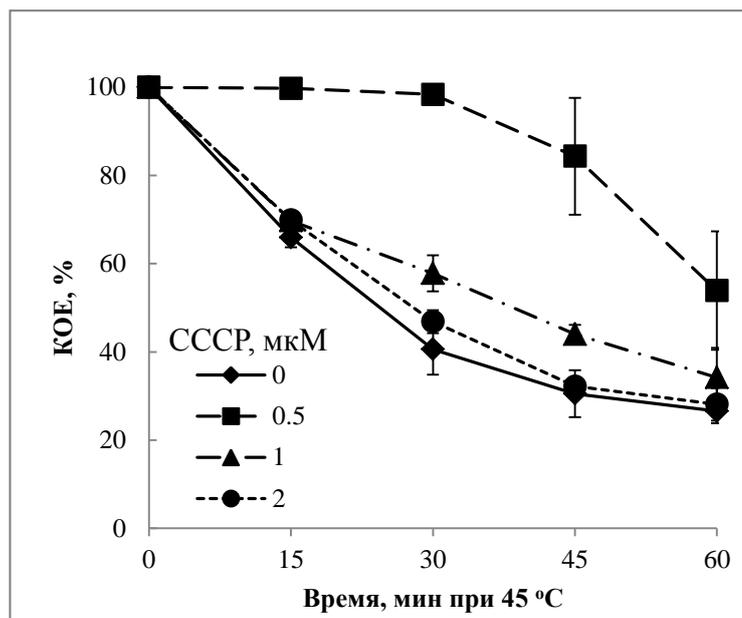
**Рис. 27.** Эффект CCCP на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °С в отсутствие CCCP; CCCP – в присутствии 0,5 мкМ CCCP. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции DCF клеток, инкубируемых при 30 и 45 °С в присутствии CCCP. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 28.** Эффект CCCP на изменение МП в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °С в отсутствие CCCP; CCCP – в присутствии 0,5 мкМ CCCP. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции МО клеток, инкубируемых при 30 и 45 °С в присутствии CCCP. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 29.** Эффект CCCP на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* (W303–1B) при тепловом воздействии 45 °С.

Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. Клетки инкубировали при 45 °С в отсутствие и присутствии CCCP. n=3. M±S.E.

наблюдалось при использовании более высоких концентраций СССР – 1, 2 мкМ.

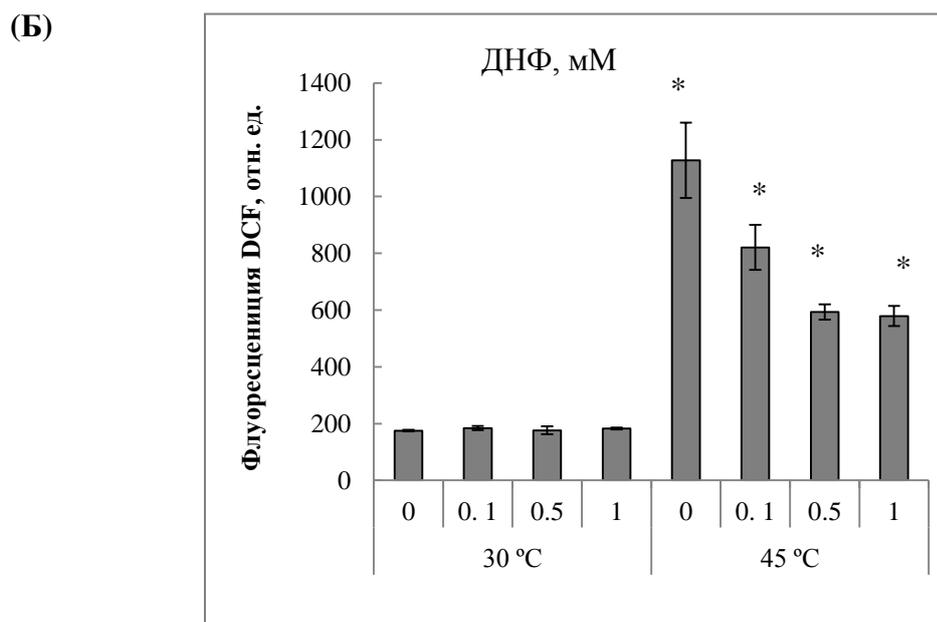
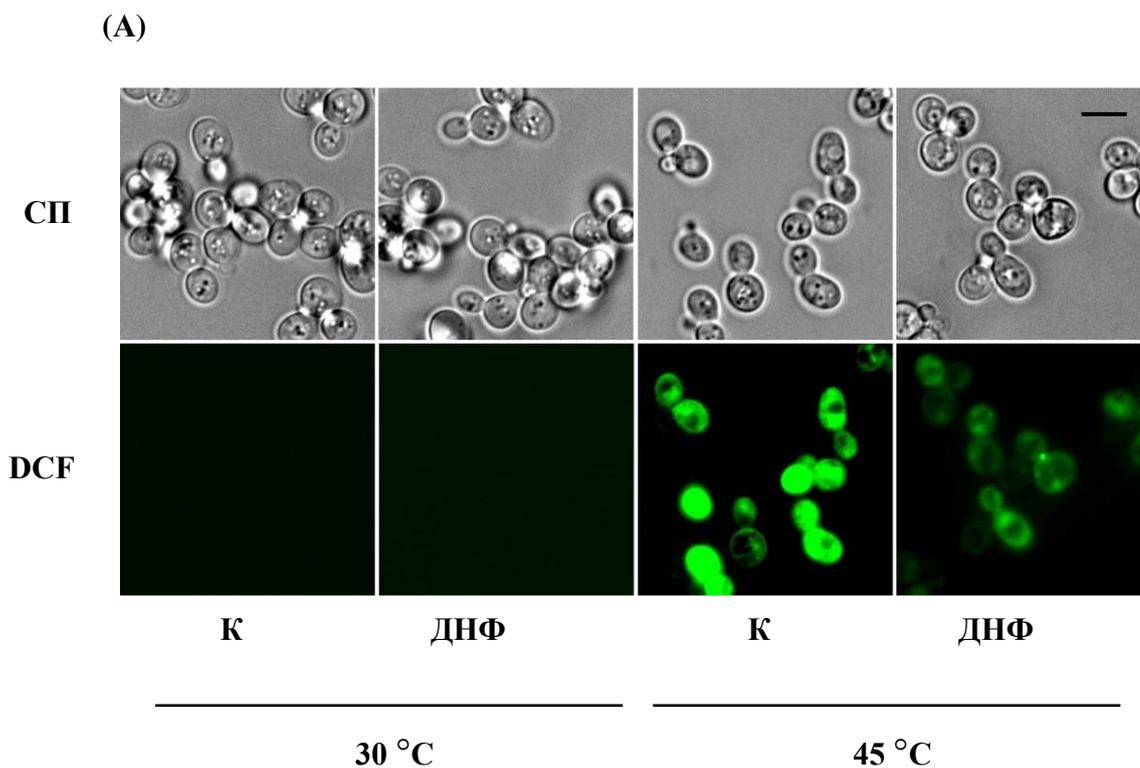
В качестве сравнения была проведена обработка в контрольных условиях и при тепловом воздействии другим классическим протонатором – ДНФ в концентрациях 0,1; 0,5; 1 мМ.

Как показано на рис. 30 А, Б, добавление протонатора ДНФ в различных концентрациях в среду инкубации клеток, инкубируемых при 30 °С, не влияло на изменение уровня АФК. Однако при тепловом воздействии добавление протонатора ДНФ во время инкубации при 45 °С подавляло повышение содержания АФК, индуцируемое тепловым воздействием (рис. 30 А, Б). При этом высокая концентрация ДНФ (1 мМ) сильнее подавляла генерацию АФК, чем низкая концентрация 0,1 мМ (рис. 30 Б).

Подобные данные получены при изучении влияния ДНФ на изменение значения МП (рис. 31 А, Б). Эффект ДНФ на МП не детектировался в случае инкубации клеток при 30 °С (рис. 31 А, Б). Как показано на рис. 31 А, Б, тепловое воздействие (45 °С) вызывало гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны. Агент ДНФ у клеток подавлял индуцируемое тепловым воздействием повышение МП в клетках дрожжей. Следует отметить, что ингибирующий эффект был сильнее выражен при действии высокой концентрации ДНФ (1 мМ) (рис. 31 Б).

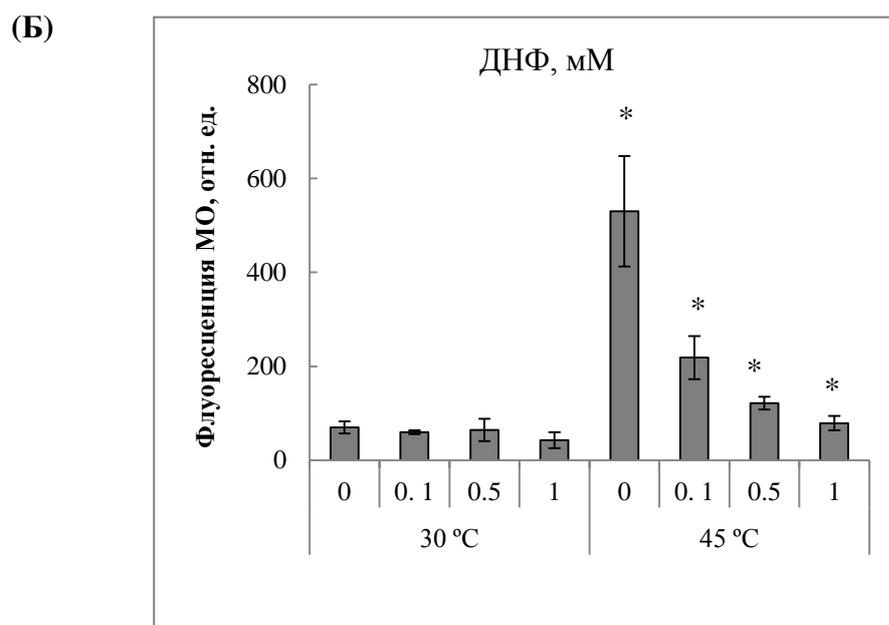
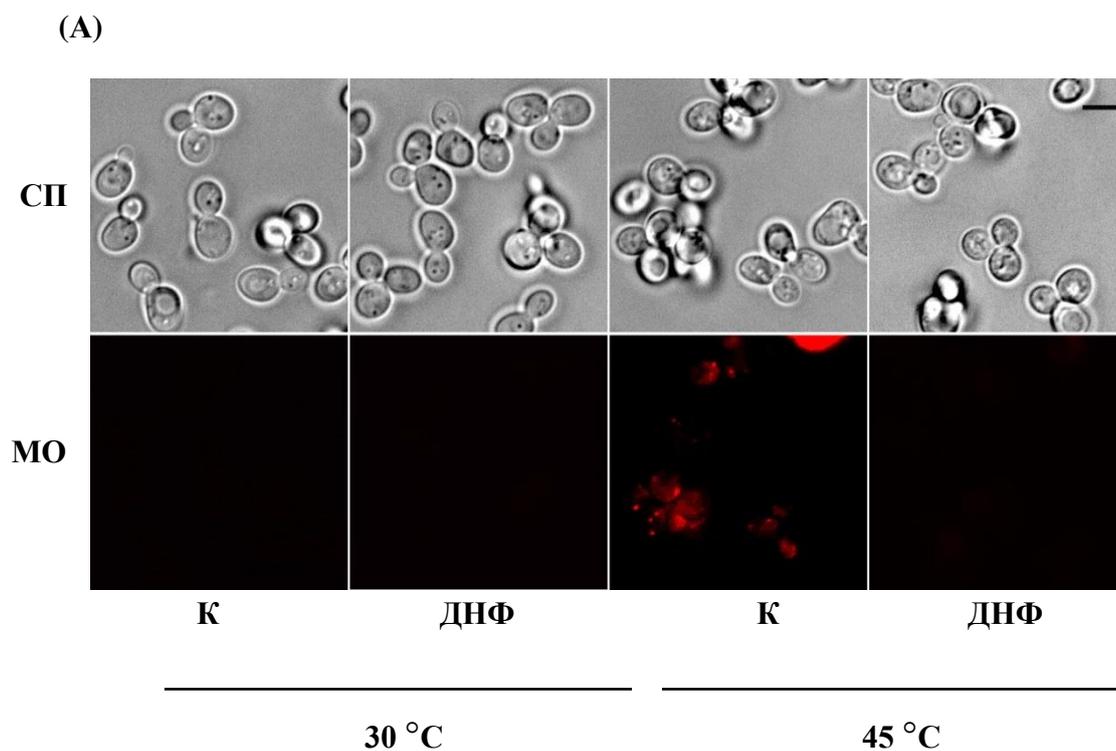
На основании данных, представленных на рис. 30 и 31, можно заключить, что протонатор ДНФ эффективно подавляет повышение АФК и увеличение МП в клетках дрожжей при тепловом воздействии. Поэтому следовало установить, повлияет ли обработка ДНФ на жизнеспособность клеток. Было обнаружено, что самая низкая концентрация ДНФ (0,1 мМ) эффективно защищает клетки дрожжей от губительного влияния теплового воздействия (рис. 32). При более высокой концентрации протекторного эффекта не наблюдалось.

Таким образом, обработка протонаторами эффективно подавляет повышение продукции АФК и увеличение МП при тепловом воздействии,



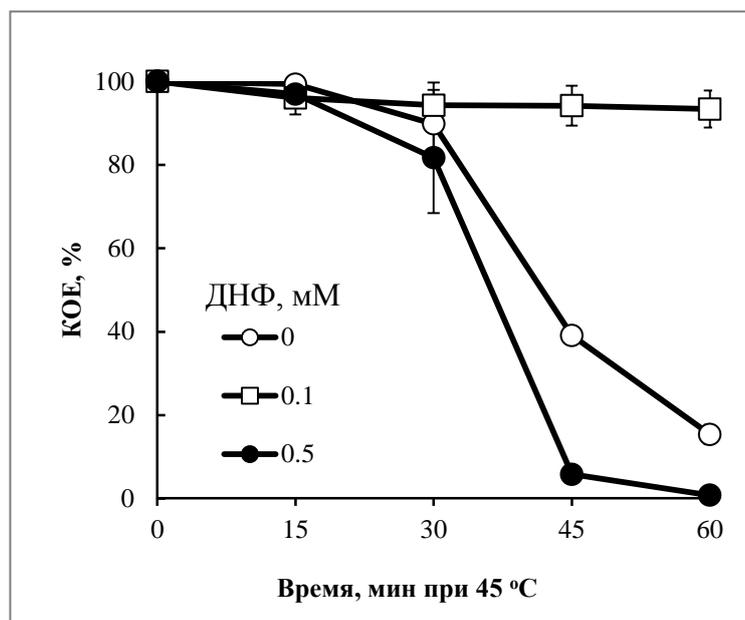
**Рис. 30.** Эффект ДНФ на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °С в отсутствие ДНФ; ДНФ – в присутствии 0,1 мМ ДНФ. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции DCF клеток, инкубируемых при 30 и 45 °С в присутствии ДНФ. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм. n=3. M±S.E. \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 31.** Эффект ДНФ на изменение МП в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °C (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. К – клетки, инкубируемые при 30 и 45 °C в отсутствие ДНФ; ДНФ – в присутствии 0,1 мМ ДНФ. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции МО клеток, инкубируемых при 30 и 45 °C в присутствии ДНФ. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 32.** Эффект ДНФ на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* (W303–1В) при тепловом воздействии 45 °С.

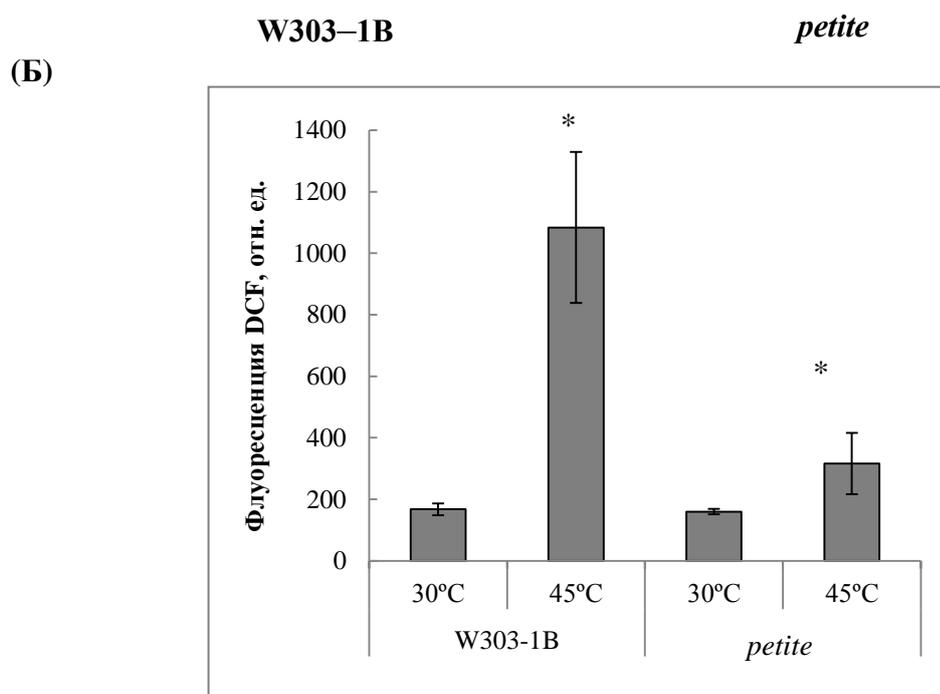
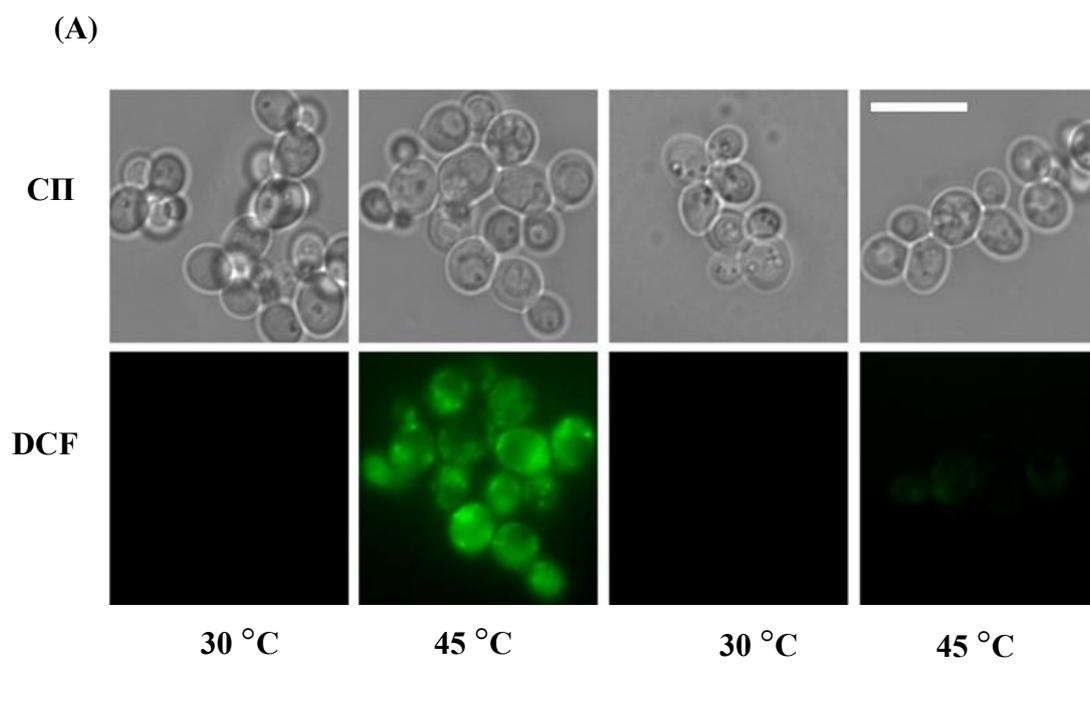
Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. Клетки инкубировали при 45 °С в отсутствие и присутствии ДНФ. n=3. М±S.E.

что приводит к повышению термотолерантности клеток дрожжей, однако отсутствует четкая зависимость между способностью протонофоров подавлять продукцию АФК и защищать клетки от гибели.

### ***3.2.3. Митохондрии являются основным сайтом продукции АФК в клетках дрожжей при тепловом воздействии***

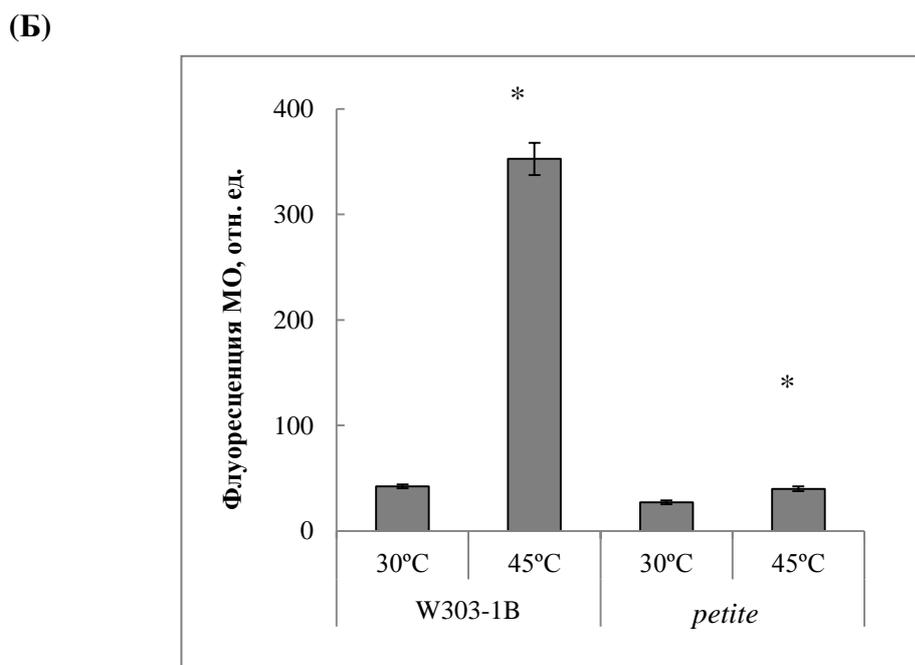
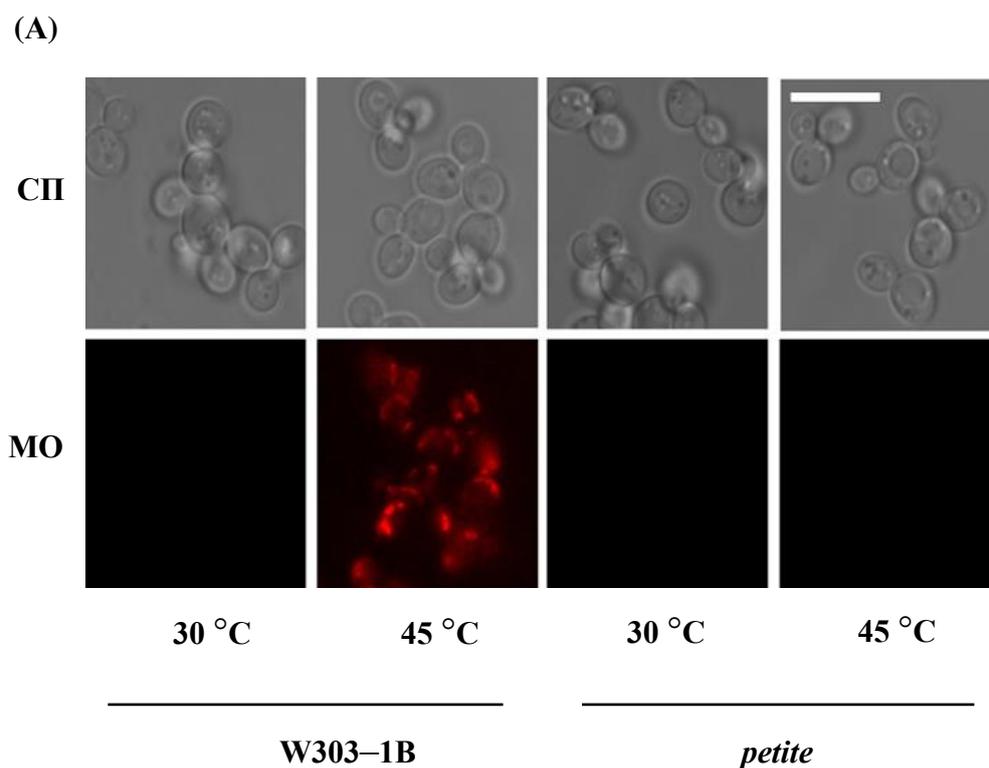
Использование в работе протонофоров ДНФ и СССР при данных условиях эксперимента не дает полной уверенности в том, что именно митохондрии являются главной причиной в генерации АФК. Поскольку в клетке протонофор может рассеивать потенциал не только на митохондриальной мембране, но и на других мембранах. Для того чтобы доказать, что именно митохондрии являются главной причиной продукции АФК в клетках дрожжей в работе был использован *petite* мутант *S. cerevisiae*. У *petite* мутантов дрожжей полностью отсутствует митохондриальная ДНК, поэтому нет важных компонентов, ответственных за формирование протонного градиента на митохондриальной мембране [Tzagoloff et al., 1986]. Как показано на рис. 33 и 34, в клетках дрожжей тепловое воздействие (45 °С, 30 мин) приводит к увеличению содержания АФК и повышению МП, соответственно. Однако мутация *petite* подавляла, одновременно, продукцию АФК и повышение МП при тепловом воздействии (рис. 33 и рис. 34). Также было выявлено, что *petite* мутация повышала устойчивость клеток дрожжей при тепловом воздействии (рис. 35).

Таким образом, нарушение функционирования митохондрий в результате мутации *petite* защищает клетки от гибели при тепловом воздействии, подавляя продукцию АФК.



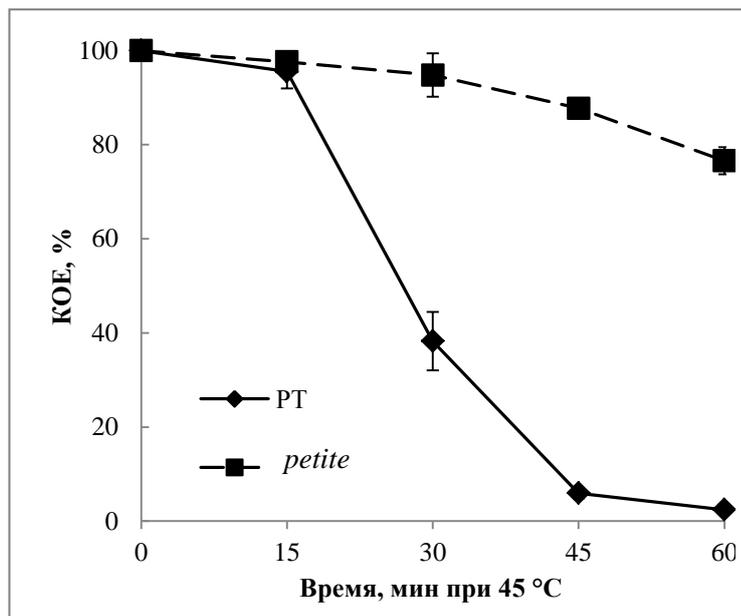
**Рис. 33.** Эффект мутации *petite* на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* (W303-1B) при тепловом воздействии 45 °C (30 мин).

(А) – микрофотографии клеток. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции DCF. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 34.** Эффект мутации *petite* на изменение МП в клетках *S. cerevisiae* (W303-1B) при тепловом воздействии 45 °C (30 мин).

(A) – микрофотографии клеток. (Б) – количественная оценка интенсивности флуоресценции МО. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм.  $n=3$ .  $M \pm S.E.$  \* – различия достоверны при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 35.** Эффект мутации *petite* на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* при тепловом воздействии 45 °C.

Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. РТ – клетки дрожжей родительского типа *S. cerevisiae* (W303–1B). n=3. M±S.E.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Зависимость между интенсивностью теплового воздействия и синтезом БТШ

Пшеница является одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире (report of Food and agricultural organization of the United Nations in *FAO statistical yearbook – world food and agriculture*, 2012). Сорт озимой пшеницы Иркутская является морозостойким в условиях Восточной Сибири [Дорофеев и др., 2003]. В начале весны озимая пшеница имеет более развитую корневую систему по сравнению с яровой пшеницей, что позволяет использовать ей зимне-весеннюю почвенную влагу. Благодаря этому озимая пшеница более устойчива к действию высоких положительных температур и засухи. Тем не менее, потери урожая озимой пшеницы от засухи и неблагоприятных температурных условий велики. Поэтому изучение физиологических и биохимических механизмов, происходящих в озимой пшенице при действии высоких температур, является актуальным.

Синтез БТШ у озимой пшеницы сравнивали с синтезом БТШ у теплолюбивой культуры сахарного тростника. В наших экспериментах повышение температуры приводило к увеличению содержания в клетках озимой пшеницы и тростника следующих БТШ: Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6 (рис. 1). БТШ являются консервативными белками и присутствуют у всех исследованных растений [Vierling, 1991; Saidi et al., 2011]. Данное утверждение подтверждается полученными в настоящей работе результатами. Как видно на рис. 1, антитела, полученные на БТШ арабидопсиса и человека, реагировали на белки пшеницы и тростника, имеющие соответствующую молекулярную массу. Таким образом, Hsp101, Hsp70, Hsp60 и Hsp17.6 (I и II класс) пшеницы и тростника имеют сходную аминокислотную последовательность с БТШ арабидопсиса. Известно, что Hsp101 участвуют в дезагрегации белков после окончания теплового стресса [Lee et al., 2005]. Hsp70 препятствует агрегации денатурированных белков, способствует рефолдингу и восстановлению их биологических функций

[Mayer, Bukau, 2005], а низкомолекулярные БТШ стабилизируют денатурированные и агрегированные белки [Vierling, 1991].

Изучение изменения содержания БТШ у озимой пшеницы и тростника в зависимости от теплового воздействия показало, что в отсутствие теплового стресса (26 °С) не наблюдалось синтеза Hsp101 и Hsp17.6, однако при тепловом воздействии 37 °С их содержание резко увеличивалось. В отличие от Hsp101 и низкомолекулярных БТШ, содержание Hsp70 у пшеницы было достаточно значительным в контрольных условиях, но тепловой стресс приводил к еще большему увеличению его количества. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Показано, что при температуре 37 °С повышается экспрессия Hsp101, Hsp70 и Hsp26 у растений пшеницы [Liu et al., 2003].

Повышение температуры воздействия выше 46 °С приводило к уменьшению содержания изучаемых БТШ у тростника и пшеницы (рис. 1). Подобные данные получены в работах [Gulli et al., 2007; Volkov et al., 2006], где тепловое воздействие 42 °С и выше приводило к ингибированию синтеза отдельных БТШ. Вероятно, что отсутствие синтеза БТШ при повышении температуры до определенного критического уровня связано с тем, что в этих условиях наблюдается гибель клеток (рис. 12 и рис. 15).

Из представленных результатов следует, что для каждой из изученных культур есть свой температурный диапазон, при котором происходит наиболее активный синтез Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6. В клетках пшеницы наиболее выраженное накопление БТШ происходило в диапазоне температур 37–39 °С, а в клетках тростника в диапазоне 37–43 °С. Очевидно, что у клеток пшеницы более низкий температурный диапазон, необходимый для синтеза исследуемых БТШ, чем у клеток сахарного тростника. Вероятно, это зависит от устойчивости растений к тепловому воздействию. Действительно, клетки пшеницы менее устойчивы к повышенным температурам, чем клетки тростника (рис. 12 и рис. 15). Соответственно, у клеток пшеницы при 43 °С наблюдается подавление синтеза Hsp101 и Hsp17.6. Однако этого не

происходит в клетках тростника (рис. 1). Следовательно, чем выше термотолерантность растительных клеток, тем выше температура, при воздействии которой происходит индукция синтеза БТШ.

Из литературных данных известно, что Hsp60, активируя каспазный каскад, является регулятором и активатором ПКГ [Xanthoudakis et al., 1999, Didelot et al., 2006]. Изменение в содержании Hsp60 при температурных обработках различной интенсивности отличалось от изменения Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6. В культуре клеток пшеницы обработка температурой 46 °С подавляла синтез Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6, однако увеличивала содержание Hsp60 (рис. 1 А). Поскольку инкубация при этих условиях вызывала отсроченную гибель клеток, то наблюдается связь между повышением количества Hsp60 и развитием гибели (рис. 12). Несколько другие данные были получены на тростнике. У тростника содержание Hsp60 в контрольных условиях было высоким, однако увеличения количества данного белка при повышении температуры воздействия не было обнаружено (рис. 1 Б). Возможно, что данное явление объясняется тем, что культура клеток тростника более устойчива к тепловому воздействию.

#### **4.2. Синтез БТШ и продукция АФК при тепловом воздействии**

При повышении температуры у растений, как и у животных [Sreedhar, Srinivas, 2002; Katschinski et al., 2000; Kikusato, Toyomizu, 2013] усиливается продукция АФК [Колупаев, Карпец, 2009; Miller, Mittler 2006; Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008; Locato et al., 2008]. Как показано в данной работе, увеличение содержания АФК в клетках пшеницы (рис. 2, 3, 17), тростника (рис. 3) и дрожжей (рис. 24) происходило при тепловом воздействии. Таким образом, продукция АФК при повышении температуры – универсальное для всех организмов явление.

Известно, что увеличение содержания АФК в клетке является одним из сигналов, приводящих к индукции синтеза БТШ при тепловом воздействии [Banzet et al., 1998; Miller, Mittler 2006; Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008). Сравнение данных по содержанию БТШ и увеличению продукции

АФК в клетках пшеницы и сахарного тростника (рис. 1 и рис. 3) при тепловом воздействии показало, что при мягком тепловом воздействии (37–39 °С) происходит повышение синтеза БТШ и увеличение уровня АФК. Однако при умеренном тепловом воздействии (45–50 °С), когда происходила максимальная генерация АФК, накопления БТШ не наблюдалось как в культуре клеток озимой пшеницы, так и в культуре клеток сахарного тростника (рис. 1 и рис. 3).

Аналогичные данные получены в работе R.A. Volkov с соавтор. [Volkov et al., 2006]. Согласно этой работе усиление генерации АФК при повышении температуры воздействия до 37 °С активировало экспрессию генов *HSP17.6*, *HSP18.2*, *APX2* в клетках *A. thaliana*. В то же время при тепловом воздействии 44 °С также происходило увеличение содержания АФК, но активации экспрессии генов БТШ не наблюдалось.

Возникает вопрос, почему не наблюдается строгой зависимости между количеством БТШ и продукцией АФК? Известно, что АФК выполняют двойную роль в клетке. Они могут активировать либо экспрессию стрессовых генов, либо развитие гибели [Креславский и др., 2012; Rhoads et al., 2006]. Очевидно, когда содержание АФК превышает пороговый уровень (45–50 °С), синтез БТШ не происходит [Rikhvanov et al., 2007; Volkov et al., 2006], и запускается процесс гибели клетки [Rhoads et al., 2006].

#### **4.3. Продукция АФК и гибель клеток при тепловом воздействии**

Максимальное увеличение уровня АФК в клетках пшеницы и тростника происходило при умеренном тепловом воздействии (45-50 °С) (рис. 3). Однако гибели клеток сразу после воздействия не наблюдалось (рис. 12 и рис. 15). Обработка данными температурами приводила к «отсроченной» гибели клеток озимой пшеницы и тростника, которая происходила после теплового воздействия во время инкубации клеток в контрольных условиях (рис. 12 и рис. 15). Таким образом, умеренное тепловое воздействие приводило к максимальной генерации АФК и развитию отсроченной гибели клеток растений.

Явление отсроченной гибели при тепловом воздействии показано другими исследователями. Например, в работе [Locato et al., 2008] выявлено, что обработка культуры клеток табака при температуре 55 °С (10 мин) не приводила к мгновенному снижению жизнеспособности. Однако после инкубации клеток в контрольных условиях при 26 °С (72 ч) происходила отсроченная гибель клеток. Развитию отсроченной гибели предшествовало усиление генерация АФК, что указывает на причинно-следственную связь между ними [Locato et al., 2008].

Эксперименты с использованием дрожжей показали, что усиление генерации АФК при умеренном тепловом воздействии играет ключевую роль в гибели дрожжей. Добавление аскорбиновой кислоты подавляло генерацию АФК (рис. 24) и повышало термотолерантность дрожжей при умеренном тепловом воздействии (рис. 26). Аналогичным образом обработка СССР и ДНФ, а также мутация *petite* подавляли генерацию АФК при тепловом воздействии и защищали клетки от гибели (рис. 27, рис. 29, рис. 30, рис.32, рис. 33, рис. 35).

Полученные данные указывают, что образование АФК играет решающую роль в развитии гибели дрожжей при умеренном тепловом воздействии. Однако протекторный эффект СССР и ДНФ на жизнеспособность дрожжей наблюдался только в низких концентрациях (0,5 мкМ и 0,1 мМ, соответственно). Протекторного эффекта не наблюдалось, если эти агенты использовали в высоких концентрациях (рис. 29 и рис. 32). Между тем, способность СССР и ДНФ подавлять продукцию АФК в клетках дрожжей возрастала по мере увеличения концентрации агентов (рис. 27 и рис. 30). Очевидно, наблюдаемое противоречие можно объяснить тем, что в высоких концентрациях эти агенты влияют на другие клеточные функции важные для термотолерантности. Известно, что СССР и ДНФ в высоких концентрациях повышают уровень цАМФ в клетках дрожжей, что, в свою очередь, может оказывать негативный эффект на термотолерантность [Piper, 1993].

Следует отметить, что не всегда наблюдается зависимость между генерацией АФК и гибелью клеток при тепловом воздействии. Тепловое воздействие при 60 °С приводило к мгновенной гибели клеток культур озимой пшеницы и сахарного тростника (рис. 11 и рис. 14), хотя при этом не наблюдалось повышения генерации АФК (рис. 3). Подобные данные были получены при использовании клеток дрожжей. Жесткое тепловое воздействие при 50 °С приводило к более значительной гибели клеток, чем умеренное тепловое воздействие при 45 °С. Однако уровень генерации АФК при 45 °С был значительно выше, чем при 50 °С [Рихванов и др., 2014].

Таким образом, полученные данные указывают, что усиление продукции АФК вносит значительный вклад в развитие гибели клеток дрожжей и растений при умеренном тепловом воздействии. При жестком тепловом воздействии гибель развивается совершенно по другому механизму, без участия АФК.

#### **4.4. Признаки ПКГ при действии повышенных температур у клеток растений**

Отсроченная или развивающаяся во времени гибель клеток, а также усиление продукции АФК указывают на активный характер процесса [Reare et al., 2008]. После воздействия теплового шока в клетках табака [Locato et al., 2008] и клетках арабидопсиса [Swidzinski et al., 2002] наблюдалась отсроченная гибель, и детектировалась «лестница» ДНК. При этом клетки погибали с конденсацией протопласта [Locato et al., 2008]. В нашей работе тепловое воздействие также приводило к увеличению доли клеток с конденсированным протопластом в клетках тростника (рис. 16), однако такого не происходило в культуре клеток пшеницы (рис. 13).

Усиление продукции АФК, отсроченная гибель, увеличение доли клеток с конденсированным протопластом являются признаками, свидетельствующими о развитии ПКГ [Reare et al., 2008]. Согласно работе [Locato et al., 2008], температурная обработка при 55 °С приводила к усилению продукции АФК в культуре клеток табака. Как показано на рис. 3

А, в культуре клеток пшеницы повышения продукции АФК при аналогичной интенсивности воздействия не наблюдалось. Однако в культуре клеток тростника при данном тепловом воздействии происходило трехкратное увеличение продукции АФК по сравнению с контролем. Различная температурная зависимость генерации АФК подтверждает вышеуказанное положение, что культура клеток тростника более устойчива к тепловому воздействию.

Таким образом, при умеренном тепловом воздействии на клетки растений происходит повышение продукции АФК, развитие отсроченной гибели клеток, увеличение доли клеток с конденсированным протопластом, и эти явления дают основания полагать, что гибель может развиваться по типу ПКГ. Как показали наши результаты, все три признака проявляются у культуры клеток тростника, и только два признака проявляются у культуры озимой пшеницы. Достоверного увеличения числа клеток с конденсированным протопластом у культуры клеток озимой пшеницы не наблюдалось.

#### **4.5. Митохондрии – источники АФК в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии**

АФК в растительной клетке могут иметь различное происхождение (редокс-системы плазмалеммы, пероксидазы, пероксисомы, хлоропласты, митохондрии) [Минибаева, Гордон, 2003; del Río et al., 2006; Baxter et al., 2014]. Одним из источников АФК при тепловом воздействии в культуре клеток растений, выращенной на свету, могут быть хлоропласты [Doyle et al., 2010]. Однако даже в зеленых тканях растений митохондрии образуют АФК при тепловом воздействии [Qi et al., 2011; Zhang et al., 2009; Schwarzländer et al., 2012]. В нашей работе использовались гетеротрофные культуры клеток озимой пшеницы и тростника, выращенные в темноте, поэтому роль хлоропластов – основного источника АФК у растений при тепловом стрессе можно исключить.

Полученные данные указывают, что митохондрии растений и дрожжей являются одним из основных источников генерации АФК при тепловом воздействии. Протонофоры СССР и ДНФ разобщают процесс дыхания и фосфолирирования, что приводит к нарушению нормального функционирования ЭТЦ митохондрий. Добавление протонофоров СССР, ДНФ подавляло повышение МП и снижало содержание АФК в клетках пшеницы (рис. 18 и рис. 19) и дрожжей (рис. 27 и рис. 30) при тепловом воздействии. Аналогичным образом добавление хелатора кальция ЭГТА и блокатора кальциевых каналов хлорида лантана подавляло повышение МП, индуцированное тепловым воздействием, и одновременно снижало генерацию АФК (рис. 20, 21).

Другим доказательством участия митохондрий растений в продукции АФК при тепловом воздействии является тесная корреляция между митохондриальным потенциалом и содержанием АФК в клетках озимой пшеницы и тростника. Повышение митохондриального потенциала сопровождается повышением содержания АФК (рис. 8 и рис. 9 А). Однако данная корреляция не всегда соблюдается (рис. 9 Б). В клетках сахарного тростника корреляция между МП и продукцией АФК наблюдалась только после 10 мин теплового воздействия.

Дифенилениодония хлорид является ингибитором НАДФН-оксидазы плазмалеммы [Roberts et al., 1995]. Ряд авторов [Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008] показали, что дифенилениодония хлорид подавлял генерацию АФК в культуре клеток растений при тепловом воздействии. На основании этого в работе [Königshofer et al., 2008] было сделано предположение, что НАДФН-оксидазы плазмалеммы участвуют в продукции АФК при тепловом воздействии. Однако дифенилениодония хлорид является также ингибитором митохондриальных флавин-содержащих ферментов [Møller, 2001], поэтому нельзя исключить, что этот агент подавляет также митохондриальную продукцию АФК. Например, делеция гена *NDB4*, кодирующего флавин-содержащий фермент (митохондриальную

альтернативную НАД(Ф)Н-дегидрогеназу) [Smith et al., 2011], или мутация в гене *SDH1*, кодирующем субъединицу комплекса II ЭТЦ митохондрий [Gleason et al., 2011], подавляли продукцию АФК в клетках арабидопсиса.

Для доказательства митохондриальной продукции АФК в клетках *S. cerevisiae* исследователи обычно используют мутанты *petite* (мутанты дыхательной недостаточности) [Guidot et al., 1993; Longo et al., 1996], у которых отсутствует митохондриальная ДНК, а значит и способность осуществлять окислительное фосфорилирование [Tzagoloff, Myers, 1986]. Показано, что мутация *petite* снижает продукцию АФК в клетках дрожжей при самых разнообразных стрессовых воздействиях [Pozniakovsky et al., 2005; Machida, Tanaka, 1999; Ludovico et al., 2002]. Аналогичным образом мутация *petite* снижала продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* при повышении температуры (рис. 33). Мутация *petite* не повышает активность антиоксидантных ферментов [Рихванов и др., 2001] и экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [Kitagaki et al., 2009], поэтому снижение образования АФК у мутанта *petite* при тепловом воздействии (рис. 33) нельзя объяснить повышением уровня антиоксидантной защиты. Таким образом, способность мутации *petite* подавлять продукцию АФК однозначно доказывает, что митохондрия является одним из основных источников АФК в дрожжевой клетке при умеренном тепловом воздействии. Принимая во внимание, что основной причиной гибели *S. cerevisiae* при повышении температуры до 45 °С является усиление продукции АФК, становится очевидным, что митохондрии дрожжевой клетки играют активную роль в развитии гибели при тепловом воздействии.

Дрожжи *S. cerevisiae* на среде с глюкозой получают энергию для роста главным образом в результате сбраживания глюкозы до этилового спирта [Traba et al., 2009]. Следовательно, даже в условиях подавления основной митохондриальной функции, синтеза АТФ, митохондрии дрожжевой клетки генерируют АФК, что имеет важное значение для развития гибели в ответ на умеренное тепловое воздействие.

#### **4.6. Митохондриальный мембранный потенциал при тепловом воздействии**

Ранее было показано, что тепловое воздействие, вызывающее негативный эффект на жизнеспособность, приводило к снижению митохондриального потенциала (МП) в протопластах арабидопсиса и риса [Zhang et al., 2009; Qi et al., 2011]. Напротив, другие исследователи показали, что тепловое воздействие, не имеющее отрицательного влияния на жизнеспособность и сопровождающееся индукцией синтеза БТШ, вызывает повышение МП в клетках арабидопсиса [Пятрикас и др., 2014], дрожжей [Федосеева и др., 2012] и млекопитающих [Balogh et al., 2005]. Чтобы разрешить имеющиеся в литературе противоречия, в настоящей работе изучали влияние теплового воздействия на изменение МП в культуре клеток озимой пшеницы и сахарного тростника в широком температурном диапазоне 37–60 °С: (а) мягкое тепловое воздействие (37–43 °С), которое вызывает индукцию синтеза БТШ (рис. 1) и не имеет отрицательного эффекта на жизнеспособность (рис. 11); (б) умеренное тепловое воздействие (45–50 °С), которое вызывает отсроченную гибель клеток (рис. 12); (с) жесткое тепловое воздействие (55–60 °С), которое вызывает мгновенную гибель клеток растений (рис. 11).

Результаты показали, что мягкое (37–43 °С) и умеренное тепловое воздействие (45–50 °С) в течение 10 и 30 мин повышало МП в клетках озимой пшеницы. Повышения МП не наблюдалось при действии жесткого теплового воздействия (55–60 °С) (рис. 6 А). Несколько иные результаты были получены в случае сахарного тростника. Повышение МП наблюдалось только после 10 мин теплового воздействия при 45–55 °С. После 30 мин теплового воздействия в культуре клеток сахарного тростника МП снижался ниже контрольного уровня, то есть наблюдалась деполяризация митохондриальной мембраны (рис. 6 Б).

Деполяризация митохондриальной мембраны служит еще одним критерием развития ПКГ [Wang, Youle, 2009]. Действительно, в клетках

сахарного тростника при тепловом воздействии наблюдается деполяризация митохондриальной мембраны (рис. 6 Б) и повышение доли клеток с конденсированным протопластом (рис. 16). В клетках озимой пшеницы после использованных тепловых обработок деполяризации митохондриальной мембраны не происходит (рис. 6 А), соответственно, не наблюдается повышения доли клеток с конденсированным протопластом (рис. 13). Таким образом, полученные данные подтверждают, что тепловое воздействие вызывает в клетках сахарного тростника развитие ПКГ.

В работе [Zhang et al., 2009] деполяризацию митохондриальной мембраны наблюдали только в протопластах *hsfA2* мутанта арабидопсиса после 120 мин теплового воздействия при 40 °С. В работе [Qi et al., 2011] деполяризация митохондриальной мембраны была зарегистрирована в протопластах риса после 15 мин воздействия при 48 °С. Таким образом, анализ полученных результатов с данными литературы указывает, что гиперполяризация митохондриальной мембраны является ранней реакцией на тепловое воздействие, которое спустя некоторое время сменяется деполяризацией. Длительность фазы гиперполяризации и деполяризации зависит от объекта исследования и от действующей температуры. У сахарного тростника деполяризация наступает после 30 мин теплового воздействия 45–55 °С (рис. 6 Б), а у озимой пшеницы даже спустя 90 мин теплового воздействия при 45 °С митохондриальный потенциал остается на высоком уровне (рис. 17 Б).

Действие на клетки других стрессоров также приводит к повышению потенциала на внутренней мембране митохондрий. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны происходит в клетках млекопитающих при обработке лигандом Fas [Banki et al., 1999], стауропорином [Scarlett et al., 2000], а также при удалении фактора роста [Vander Heiden et al., 1999]. Подобные данные получены и на клетках растений при обработке камптотецином [Weir et al., 2003], внеклеточной АТФ [Sun et al., 2012].

Таким образом, тепловое воздействие приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны в клетках культур пшеницы (рис. 6 А), тростника (рис. 6 Б) и дрожжей (рис. 25). Очевидно, повышение потенциала наблюдается и при других абиотических воздействиях на растения. Показано, что холодное воздействие приводит к повышению МП в культуре клеток озимой пшеницы и сахарного тростника [Lyubushkina et al., 2014] (рис. 22 и рис. 23). Полученные данные указывают на то, что повышение потенциала на внутренней мембране митохондрий является ранней универсальной реакцией на разные стрессовые воздействия в клетках животных, растений и дрожжей. Причем гиперполяризация может предшествовать как активации экспрессии стрессовых генов [Федосеева и др., 2012; Пятрикас и др., 2014], так и развитию ПКГ [Skulachev, 2002].

Почему в одних случаях развитие ПКГ сопровождается гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны, а в других, наоборот, деполяризацией? Одним из обязательных процессов, происходящих при развитии ПКГ, является выход цитохрома *c* из митохондрий [Rikhvanov et al., 2007]. Безусловно, выход цитохрома *c* из митохондрий при развитии ПКГ сопряжен с деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны, поскольку этот процесс, по-видимому, определяется открытием митохондриальной поры [Vianello et al., 2007]. Однако это событие происходит на более поздних стадиях развития ПКГ. Поэтому можно предполагать, что гиперполяризация митохондриальной мембраны является индикатором ранней стадии ПКГ, а на более поздней стадии наблюдается ее деполяризация. Действительно, в настоящей работе показано, что умеренное тепловое воздействие на клетки тростника приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны (после 10 мин действия температуры 45–55 °С), которая в последующем сменяется деполяризацией (после 30 мин действия температуры 45–55 °С) (рис. 6 Б).

#### **4.7. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны и продукция АФК**

Продукция АФК является одним из побочных продуктов функционирования дыхательной цепи митохондрий растений [Møller, 2001]. Показано, что у клеток арабидопсиса и табака наблюдается усиление продукции АФК митохондриями при тепловом воздействии [Zhang et al., 2009; Qi et al., 2011; Schwarzländer et al., 2009]. Результаты, полученные в нашей работе, свидетельствуют, что в гетеротрофных культурах клеток озимой пшеницы и тростника, а также в клетках дрожжей при тепловом воздействии усиливается генерация АФК, а митохондрии являются одним из основных его источников. Повышение продукции АФК сопровождается повышением митохондриального мембранного потенциала, что позволяет предполагать причинно-следственную связь между этими явлениями. Данная связь подтверждается следующими результатами. Во-первых, наблюдалась положительная корреляция между повышением содержания АФК и митохондриальным потенциалом у клеток озимой пшеницы (рис. 3 А, рис. 6 А). Во-вторых, снижение потенциала на внутренней митохондриальной мембране при действии протонофоров, а также в результате мутации *petite* снижало продукцию АФК у клеток озимой пшеницы и дрожжей (рис. 19, рис. 27, рис. 30, рис. 33).

Вероятно, повышение митохондриального потенциала при тепловом воздействии индуцирует усиление генерации АФК. Данное предположение согласуется с теорией В.П. Скулачева, согласно которой перевосстановление дыхательной цепи может являться следствием повышения митохондриального потенциала, что, в свою очередь, стимулирует продукцию АФК [Skulachev, 1998]. На изолированных митохондриях млекопитающих [Korshunov et al., 1997] показано, что в отсутствие стресса повышение митохондриального потенциала сопровождается усилением содержания АФК. Очевидно, это правило выполняется в целых клетках при действии стрессовых факторов. В клетках дрожжей [Pozniakovsky et al., 2005]

и культуре клеток тополя [Sun et al., 2012] обработка амиодароном и АТФ, соответственно, повышали митохондриальный потенциал и усиливали генерацию АФК, а снижение митохондриального потенциала в результате обработки протонофором CCCP подавляло продукцию АФК.

Однако корреляционная зависимость между повышением потенциала и увеличением содержания АФК не всегда выполняется. После 10 и 30 мин теплового воздействия при 45 °С у клеток озимой пшеницы наблюдалась корреляционная зависимость между повышением митохондриального потенциала и увеличением продукции АФК (рис. 8). Однако после 60 мин обработки при 45 °С продукция АФК снижалась, а митохондриальный потенциал, наоборот, возрастал (рис. 17 А, Б). Это противоречие можно объяснить тем, что при увеличении длительности теплового воздействия активируются антиоксидантные ферменты, которые нейтрализуют АФК, несмотря на высокое значение митохондриального потенциала. Показано, что в клетках *A. thaliana* тепловое воздействие при 45 °С индуцировало экспрессию гена *APX1b*, кодирующего аскорбатпероксидазу [Larkindale et al., 2008], а в клетках табака тепловое воздействие при 55 °С повышало активность каталазы [Locato et al., 2008].

Зависимость между повышением МП и увеличением содержания АФК также не всегда выполняется в клетках сахарного тростника (рис. 9). Корреляция наблюдается между МП и продукцией АФК после 10 мин теплового воздействия, однако при тепловом воздействии 45–50 °С в течение 30 мин в клетках культуры сахарного тростника происходило увеличение уровня АФК, но при этом наблюдалась деполяризация внутренней митохондриальной мембраны (рис. 9). Чем же можно объяснить данное противоречие?

Общепринято, что митохондриальная продукция АФК усиливается при перевосстановлении дыхательной цепи [Rhoads et al., 2006; Skulachev, 1998]. Чтобы предотвратить этот процесс, в митохондриях активируется альтернативная оксидаза и разобщающие белки [Møller, 2001].

Перевосстановление дыхательной цепи может наблюдаться при двух условиях. Во-первых, когда скорость поступления электронов превышает способность дыхательной цепи их транспортировать [Møller, 2001]. Во-вторых, когда ингибируется активность терминальных оксидаз. Например, ингибирование комплекса III антимицином А приводит к перевосстановлению компонентов комплекса III, усилению продукции АФК и снижению МП [Suski et al., 2012]. Вероятно, первый механизм наблюдается на ранней стадии теплового воздействия и зависит от увеличения митохондриального потенциала. Второй механизм наблюдается, когда нарушается функционирование дыхательной цепи, в результате выхода цитохрома *c* из митохондрий.

Таким образом, умеренное тепловое воздействие на ранней стадии приводит к повышению содержания АФК, которое зависит от увеличения потенциала на внутренней митохондриальной мембране у изученных культур клеток растений и дрожжей. Однако не только тепловое воздействие, но и холодное воздействие, как показано (рис. 22, рис. 23) [Lyubushkina et al., 2014], приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и, как следствие, к увеличению уровня АФК.

#### **4.8. Зависимость между повышением митохондриального потенциала и внутриклеточным кальциевым гомеостазом**

Известно, что тепловой стресс приводит к кратковременному повышению уровня кальция в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ), что играет важную роль либо в активации экспрессии генов БТШ растений [Saidi et al., 2011], либо в гибели клетки [Li et al., 2012; Scott, Logan, 2008; Gong et al., 1998]. Нарушение поступления кальция в цитозоль в результате обработки хелаторами кальция, блокаторами кальциевых каналов, а также мутации в генах, кодирующих кальциевые каналы, значительно изменяет экспрессию генов БТШ растений [Zheng et al., 2012; Gao et al., 2012; Zhu et al., 2013; Пятрикас и др., 2014]. В то же время подавление поступления кальция в клетки повышает их устойчивость к тепловому воздействию [Scott, Logan,

2008]. Другим фактором, способным как активировать экспрессию БТШ [Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008], так и приводить к гибели клетки, является усиление продукции АФК [Rhoads et al., 2006; Колупаев, Карпец, 2009; Креславский и др., 2012].

Показано, что существует взаимосвязь между продукцией АФК и уровнем  $[Ca^{2+}]_{цит}$  [Гордеева и др., 2003]. Это положение подтверждается в данной работе – агенты, предотвращающие поступление  $Ca^{2+}$  в цитозоль, подавляют продукцию АФК при тепловом воздействии в культуре клеток озимой пшеницы (рис. 20 Б и рис. 21 Б). Источником усиления продукции АФК в растительной клетке при стрессовом воздействии может быть повышение активности НАДФН-оксидаз или пероксидаз класса III [Глянко и др., 2010; Минибаева, Гордон, 2003]. Известно, что эти ферменты активируются при повышении уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле [Колупаев и др., 2012] и, по мнению некоторых авторов, могут участвовать в продукции АФК в гетеротрофных культурах растений при повышении температуры [Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008]. Однако маловероятно, что блокаторы кальциевых каналов и хелаторы внеклеточного кальция подавляют продукцию АФК в культуре клеток растений, наблюдаемую при повышении температуры, в результате ингибирования активности НАДФН-оксидаз или пероксидаз класса III. Показана прямая зависимость между способностью хлорида лантана и ЭГТА подавлять продукцию АФК и снижать митохондриальный потенциал (рис. 20 и рис. 21). Поскольку повышение генерации АФК при тепловом воздействии зависит от повышения митохондриального потенциала, следовательно, блокирование поступления  $Ca^{2+}$  в цитозоль подавляет продукцию АФК митохондриями. Впрочем, нельзя исключить, что повышение митохондриальной продукции АФК может активировать НАДФН-оксидазу, что, в свою очередь, приведет к каскадному усилению продукции АФК.

Вероятно, что причиной гиперполяризации митохондриальной мембраны является повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$ . Показано, что добавление

внеклеточного АТФ [Loro et al., 2012; Sun et al., 2012], осмотический стресс [Loro et al., 2012; Logan, Knight, 2003] и низкие температуры [Logan, Knight, 2003] вызывают временное повышение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит.}$ . В настоящей работе было показано, что при нарушении  $Ca^{2+}$  гомеостаза в результате действия хелатора кальция (рис. 20 А) и ингибитора кальциевых каналов (рис. 21 А), происходит снижение потенциала на внутренней мембране митохондрий. Это указывает на то, что повышение МП зависит от уровня  $[Ca^{2+}]_{цит.}$

Таким образом, уровень ионов кальция в цитозоле влияет на потенциал на внутренней мембране митохондрий и продукцию митохондриальных АФК. Гомеостаз цитозольного кальция вовлечен в ответ клетки на тепловое воздействие.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение температуры, а также другие стрессовые воздействия индуцируют в клетках растений и животных синтез белков теплового шока, которые защищают клетку от гибели. Механизм восприятия и трансдукции сигнала, приводящего к активации экспрессии БТШ у растений, остается во многом неизвестным [Рихванов и др., 2014]. Однако существуют результаты, указывающие, что временное повышение уровня цитозольного кальция и усиление продукции активных форм кислорода (АФК) играют ключевую роль в экспрессии БТШ [Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008; Saidi et al., 2011; Колупаев и др., 2013].

Ранее было показано, что тепловой стресс, приводящий к активации экспрессии БТШ, сопровождается повышением митохондриального потенциала на внутренней мембране *A. thaliana* и *S. cerevisiae*. Агенты, снижающие митохондриальный потенциал при действии теплового стресса, подавляли экспрессию БТШ и развитие индуцированной термотолерантности [Rikhvanov et al., 2005, 2007; Федосеева и др., 2012; Пятрикас и др., 2014]. В результате было установлено, что митохондрии регулируют экспрессию генов БТШ растений, а изменение митохондриального потенциала играет в этом процессе решающую роль [Рихванов и др., 2014]. Однако оставалась неизвестным, почему наблюдается повышение митохондриального потенциала и к каким последствием оно приводит.

Было известно, что в изолированных митохондриях растений и животных [Korshunov et al., 1997; Casolo et al., 2000], а также в клетках млекопитающих в отсутствие стресса наблюдается связь между митохондриальным потенциалом и продукцией АФК [Suski et al., 2012]. Аналогичная зависимость была продемонстрирована в клетках дрожжей [Pozniakovsky et al., 2005] и культуре клеток тополя [Sun et al., 2012] при обработке амиодароном и внеклеточной АТФ. Более того, показано, что повышение митохондриального потенциала зависит от уровня цитозольного кальция [Pozniakovsky et al., 2005; Balogh et al., 2005; Sun et al., 2012].

Изучение зависимости между митохондриальным потенциалом, продукцией АФК и гомеостазом внутриклеточного кальция при тепловом воздействии у растений и дрожжей ранее не проводилось. Поэтому было предположено, что повышение митохондриального потенциала, наблюдаемое при повышении температуры в клетках растений и дрожжей, является следствием повышения уровня цитозольного кальция. В свою очередь, повышение митохондриального потенциала приводит к усилению продукции АФК.

Действительно, результаты, полученные при выполнении настоящей работы, свидетельствуют, что тепловое воздействие вызывает одновременное повышение митохондриального потенциала и усиление продукции АФК в культуре клеток растений и дрожжей. Наблюдается тесная корреляционная зависимость между повышением митохондриального потенциала и усилением продукции АФК, а деполяризация митохондриальной мембраны подавляет продукцию АФК при тепловом воздействии. Таким образом, доказано, что следствием повышения митохондриального потенциала при тепловом воздействии в клетках растений и дрожжей является усиление продукции АФК митохондриями.

Способность внеклеточных хелаторов кальция и блокаторов кальциевых каналов подавлять повышение митохондриального потенциала – гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны и одновременно снижать продукцию АФК свидетельствует, что гомеостаз внутриклеточного кальция вовлечен в процесс повышения митохондриального мембранного потенциала при тепловом воздействии. Вероятно, кратковременное повышение уровня кальция в цитозоле приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны, что, в свою очередь, усиливает митохондриальную продукцию АФК.

Прямая зависимость продукции АФК от значения митохондриального потенциала свидетельствует, что в гетеротрофных культурах клеток растений и дрожжей митохондрии являются одним из основных источников образования АФК при тепловом воздействии. Поскольку в клетках дрожжей

и растений усиление продукции АФК значительно стимулирует гибель клеток при умеренном повышении температуры, становится очевидным, что митохондрии играют активную роль в развитии гибели.

Таким образом, полученные данные указывают на следующую последовательность событий при тепловом воздействии, приводящих либо к экспрессии БТШ и развитию устойчивости клетки, либо к развитию ПКГ. Сначала тепловое воздействие вызывает кратковременное повышение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  [Finka et al., 2012; Gao et al., 2012; Tunc-Ozdemir et al., 2013]. Ионы  $Ca^{2+}$  активируют кальций-зависимые протеинкиназы [Saidi et al., 2011] и кальмодулин. Кальмодулин, в свою очередь, активирует кальмодулин-зависимые протеинкиназы и фосфатазы. Все эти события потенциально могут приводить к активации транскрипционных факторов, запускающих экспрессию БТШ. Повышение температуры выше критического уровня вызывает чрезмерное повышение уровня кальция в цитозоле. В этом случае экспрессия БТШ ингибируется, и развивается ПКГ [Scott, Logan, 2008; Li et al., 2012]. Поэтому, чтобы повышение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  активировало экспрессию БТШ необходимо, чтобы это повышение происходило в определенное время, было кратковременным и не превышало определенного уровня. Необходимый уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$  достигается в результате выкачивания избытка кальция из цитозоля наружу клетки или депонирования его в вакуоль или ЭПР. Митохондрии растительной и животной клетки, а также, возможно, митохондрии дрожжей являются временным депо кальция в стрессовых условиях. В результате формируется определенная сигнатура  $Ca^{2+}$  в цитозоле, необходимая для оптимальной активации экспрессии БТШ.

Поступление  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в митохондрии сопровождается повышением митохондриального потенциала, что способствует усилению генерации митохондриальных АФК. Повышение генерации АФК до определенного уровня активирует экспрессию БТШ. Превышение этого уровня активирует гибель клетки. Чрезмерное повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в митохондриях приводит к открытию митохондриальной поры, деполяризации внутренней

митохондриальной мембраны, выходу цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль, к еще большему усилению продукции АФК и, в конечном счете, к активации ПКГ. Митохондрии, таким образом, выступают как передатчик и реле кальциевого сигнала, модулируют уровень кальция в цитозоле и, вероятно, в других клеточных органеллах, а также стимулируют продукцию АФК, что и определяет митохондриальную ретроградную регуляцию.

## **ВЫВОДЫ**

1. Умеренное тепловое воздействие приводит к усилению продукции активных форм кислорода (АФК) в культуре клеток растений и дрожжей. Продукции АФК не наблюдается при жестком тепловом воздействии.

2. Одним из основных источников АФК в гетеротрофных клетках растений и дрожжей в условиях теплового воздействия являются митохондрии.

3. Повышение продукции АФК является причиной гибели клеток растений и дрожжей при умеренном тепловом воздействии.

4. Повышение продукции АФК на ранней стадии теплового воздействия сопровождается гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны. Полученные данные указывают, что продукция АФК при тепловом воздействии в значительной степени является следствием гиперполяризации митохондриальной мембраны.

5. Изменение внутриклеточного кальциевого гомеостаза определяет повышение митохондриального мембранного потенциала при тепловом воздействии и, соответственно, усиление продукции АФК.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобийной инфекции в зависимости от действия абиотических и биотических факторов / А.К. Глянько [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. № 4. – С. 479–485.
2. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246–264.
3. Влияние нарушений в функционировании дыхательного комплекса I на уровень активных форм кислорода в клетках арабидопсиса / В.И. Тарасенко [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 9–13.
4. Гарифзянов А.Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А.Р. Гарифзянов, Н.Н. Жуков, В.В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2. – С. 21.
5. Глянько А.К. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений / А.К. Глянько, А.А. Ищенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. № 5. – С. 509–518.
6. Гордеева А.В. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках / А.В. Гордеева, Р.А. Звягильская, Ю.А. Лабас // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 10. – С. 1318–1322.
7. Гривенникова В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 245–296.
8. Дорофеев Н.В. Озимая пшеница в Иркутской области / Н.В. Дорофеев, А.А. Пешкова, В.К. Войников // Арт-Пресс, Иркутск. – 2003. – 175 с.
9. Колупаев Ю.Е. Салициловая кислота и устойчивость растений к абиотическим стрессорам / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец // Вісник

харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2009. – № 2. – С. 19–39.

10. Колупаев Ю.Е. Ферментативные источники активных форм кислорода в растительных клетках: регуляция активности и участие в стрессовых реакциях / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец, Т.О. Ястреб // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. Серія Біологія. – 2012. – № 1. – С. 6–22.

11. Колупаев Ю.Е. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы / Ю.Е. Колупаев, А.И. Обозный, Н.В. Швиденко // Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – С. 221–229.

12. Креславский В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163–178.

13. Медведев С.С. Физиология растений / С.С. Медведев // Изд-во: БХВ-Петербург. – 2013. – 512 с.

14. Мельников Э.Э. Молекулярные шапероны / Э.Э. Мельников, Т.В. Ротанова // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 1. – С. 5–14.

15. Механизм гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке. Влияние циклогексимида на этот процесс / Е.Г. Рихванов [и др.] // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 1. – С. 22–32.

16. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе / Е.Г. Рихванов [и др.] // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 2. – С. 155–169.

17. Минибаева Ф.В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе / Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 459–464.

18. Митохондрия как многоликий янус / Д.Б. Зоров [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1371–1384.
19. Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии HSP101 *Arabidopsis thaliana* при тепловом стрессе и действии амиодарона / Д.В. Пятрикас [и др.] // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, №1 – С. 88–98.
20. Мутация *petite* подавляет индукцию синтеза белка теплового шока (HSP104) *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе роста / И.В. Федосеева [и др.] // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 273–281.
21. Побежимова Т.П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных / М.: ООО «НПК Промэкспобезопасность». – 2004. – 98 с.
22. Прадедова Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Саляев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 177–185.
23. Эффект амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Федосеева И.В. [и др.] // Биохимия. – 2012. – Т. 77. № 1. – С. 99–109.
24. A heat-activated calcium-permeable channel – arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6 - is involved in heat shock responses / F. Gao [et al.] // Plant J. – 2012. – V. 70, N 6. – P. 1056–1069.
25. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast / C.W. Gourlay [et al.] // J. Cell Biol. – 2004. – V. 164, N 6. – P. 803–809.
26. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells / N. Banzet [et al.] // Plant J. – 1998. – V. 13, N 4. – P. 519–527.
27. Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco BY-2 cells / T. Ishikawa [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46, N 8. – P. 1264–71.

28. Adam-Vizi V. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species / V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos // Trends Pharmacol. Sci. – 2006. – V. 27, N 12. – P. 639–45.
29. Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in Arabidopsis plants / X. Zhu [et al.] // Mol. Plant. – 2013. – V. 6, N 2. – P. 444–55.
30. Ahn S.G. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress / S.G. Ahn, D.J. Thiele // Genes Dev. – 2003. – V. 17, N 4. – P. 516–28.
31. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H Dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2011. – V. 52, N 7. – P. 1222–1237.
32. Amirsadeghi S. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress / S. Amirsadeghi, C.A. Robson, G.C. Vanlerberghe // Physiologia Plantarum. – 2007. – V. 129. – P. 253–266.
33. An ATP signalling pathway in plant cells: extracellular ATP triggers programmed cell death in *Populus Euphratica* / J. Sun [et al.] // Plant Cell Environ. – 2012. – V. 35, N 5. – P. 893–916.
34. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 373–399.
35. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? / L. Nover [et al.] // Cell Stress Chaperones. – 2001. – V. 6, N 3. – P. 177–189.
36. Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress / A. Nishizawa [et al.] // Plant J. – 2006. – V. 48, N 4. – P. 535–547.

37. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, N 2. – P. 391–396.
38. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination / S. Koussevitzky [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283, N 49. – P. 34197–34203.
39. Autophagy is induced through the ROS-TP53-DRAM1 pathway in response to mitochondrial protein synthesis inhibition / X. Xie [et al.] // *Autophagy.* – 2012. – V. 8, N 7. – P. 1071–1084.
40. Banki K. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling / K. Banki, E. Hutter, N.J. Gonchoroff, A. Perl // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162, N 3. – P. 1466–1479.
41. Baxter A. ROS as key players in plant stress signalling / A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki // *J. Exp. Bot.* – 2014. – V. 65, N 5. – P. 1229–40.
42. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange / M.G. Vander Heiden [et al.] // *Mol. Cell.* – 1999. – V. 3, N 2. – P. 159–167.
43. Becker J. Hydrogen peroxide activates immediate binding of a *Drosophila* factor to DNA heat-shock regulatory element *in vivo* and *in vitro* / J. Becker, V. Mezger, A.M. Courgeon et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – V. 189, N 3. – P. 553–558.
44. Bitá C.E. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops / C.E. Bitá, T. Gerats // *Front Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – P. 273.
45. Braidot E. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates / E. Braidot, E. Petrucci, A. Vianello [et al.] // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 451, N 3. – P. 347–350.
46. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat / H.T. Liu [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132, N 3. – P. 1186–1195.

47. Cao J. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production / J. Cao, J.M. Barbosa, N.K. Singh, R.D. Locy // *Yeast*. – 2013. – V. 30, N 4. – P. 129–44.
48. Characterization of rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions / G.F. Wang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14, N 5. – P. 9440–58.
49. Circu M.L. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – V. 48, N 6. – P. 749–762.
50. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 / G. Kroemer [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – V. 16, N 1. – P. 3–11.
51. Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA / J.L. Campbell [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – V. 1517, N 2. – P. 270–277.
52. Comparison of intact *Arabidopsis thaliana* leaf transcript profiles during treatment with inhibitors of mitochondrial electron transport and TCA cycle / A.L. Umbach [et al.] // *PLoS. One.* – 2012. – V. 7, N 9. – C. 44339.
53. Cosio C. Specific functions of individual class III peroxidase genes // C. Cosio, C. Dunand // *Exp. Bot.* – 2009. – V. 60, N 2. – P. 391–408.
54. A Cyclic nucleotide-gated channel (CNGC16) in pollen is critical for stress tolerance in pollen reproductive development / M. Tunc-Ozdemir [et al.] // *Plant Physiol.* – 2013. – V. 161, N 2. – P. 1010–20.
55. Cytochrome *c* is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death / R.A. Vacca [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, N 1. – P. 208–219.

56. Dat J.F. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco / J.F. Dat, H. Lopez-Delgado, C.H. Foyer, I.M. Scott // *J. Plant Physiol.* – 2000. – V. 156. – P. 659–665.
57. Davidson J.F. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* / J.F. Davidson, B. Whyte, P.H. Bissinger, R.H. Schiestl // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93, N 10. – P. 5116–5121.
58. Davidson J.F. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* / J.F. Davidson, R.H. Schiestl // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – V. 21, N 24. – P. 8483–8489.
59. Davletova S. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis* / S. Davletova, K. Schlauch, J. Coutu, R. Mittler // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139, N 2. – P. 847–856.
60. De Pinto M.C. Redox regulation in plant programmed cell death / M.C. De Pinto, V. Locato, L. De Gara // *Plant Cell Environ.* – 2012. – V. 35, N 2. – P. 234–44.
61. Desikan R. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures / R. Desikan, A. Reynolds, J.T. Hancock, S.J. Neill // *Biochemistry.* – 1998. – V. 330. – P. 115–120.
62. Do mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? / E.G. Rikhvanov [et al.] // *Curr. Genet.* – 2005. – V. 48. – P. 44–59.
63. Doyle S.M. Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures / S.M. Doyle, M. Diamond, P.F. McCabe // *J. Exp. Bot.* – 2010. – V. 61, N 2. – P. 473–482.
64. Doyle S.M. Type and cellular location of reactive oxygen species determine activation or suppression of programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures / S.M. Doyle, P.F. McCabe // *Plant Signal Behav.* – 2010. – V. 5, N 4. – P. 467–8.

65. Fang J. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide / J. Fang, D.S. Beattie // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – V. 34, N 4. – P. 478–488.
66. Food and agricultural organization of the United Nations (2012) in FAO statistical yearbook – world food and agriculture, Rome, Italy; [www.fao.org](http://www.fao.org).
67. Four members of the *HSP101* gene family are differently regulated in *Triticum durum* Desf. / M. Gulli [et al.] // FEBS Lett. – 2007. – V. 581, N 25. – P. 4841–4849.
68. Garmier M. Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in Arabidopsis / M. Garmier, A.J. Carroll, E. Delannoy [et al.] // Plant Physiol. – 2008. – V. 148, N 3. – P. 1324–1341.
69. Gao C. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure / C. Gao, D. Xing, L. Li, L. Zhang // Planta. – 2008. – V. 227, N 4. – P. 755–67.
70. Genetic analysis reveals domain interactions of arabidopsis Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system / U. Lee [et al.] // Plant Cell. – 2005. – V. 17, N 2. – P. 559–571.
71. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells / J.L. Scarlett [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – V. 475, N 3. – P. 267–272.
72. Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization / S. Kotak [et al.] // Plant J. – 2004. – V. 39, N 1. – P. 98–112.
73. Gong M. Heat-shock-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance / M. Gong, A. van der Luit, M. Knight, A. Trewavas // Plant Physiol. – 1998. – V. 116. – P. 429–437.

74. Gross A. Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X<sub>L</sub> / A. Gross, K. Pilcher, E. Blachly-Dyson [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 20, N 9. – P. 3125–3136.

75. Guidot D.M. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo* / D.M. Guidot, J.M. McCord, R.M. Wright, J.E. Repine // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268, N 35. – P. 26699–26703.

76. Hasanuzzaman M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. Abiotic stress–plant responses and applications in agriculture / M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Fujita // – 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/54833>.

77. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death / C. Didelot [et al.] // *Handbook Exp. Pharmacol.* – 2006. – V. 172. – P. 171–198.

78. Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections / I. Horvath [et al.] // *Prog. Lipid Res.* – 2012. – V. 51. – P. 208–220.

79. Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array / D. Qin [et al.] // *BMC Genomics.* – 2008. – V. 9. – P. 432.

80. Hong S.W. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress / S.W. Hong, E. Vierling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V.97, N 8. – P.4392–4397.

81. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis / S. Xanthoudakis [et al.] // *EMBO J.* – 1999. – V. 18, N 8. – P. 2049–2056.

82. ISC1-dependent metabolic adaptation reveals an indispensable role for mitochondria in induction of nuclear genes during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae* / H. Kitagaki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284, N 16. – P. 10818–10830.

83. Jacquier-Sarlin M.R. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin / M.R. Jacquier-Sarlin, B.S. Polla // *Biochem. J.* – 1996. – V. 318. – P. 187–193.
84. Katschinski D.M. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis / D.M. Katschinski, K. Boos, S.G. Schindler, J. Fandrey // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, N 28. – P. 21094–8.
85. Kikusato M. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria / M. Kikusato, M. Toyomizu // *PLoS. One.* – 2013. – V. 8, N 5. – P. 64412.
86. Klionsky D.J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions / D.J. Klionsky // *Cell Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 7–18.
87. Königshofer H. Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production / H. Königshofer, H.W. Tromballa, H.G. Loppert // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31. – P. 1771–1780.
88. Korshunov S.S. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria / S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 416. – P. 15–18.
89. Kowaltowski A.J. Mitochondria and reactive oxygen species / A.J. Kowaltowski, N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, A.E. Vercesi // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 47, N 4. – P. 333–343.
90. Kubota H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival / H. Kubota // *J. Biochem.* – 2009. – V. 146, N 5. – P. 609–616.
91. Kumar N. The BAG homology domain of Sn11 cures yeast prion [URE3] through regulation of Hsp70 chaperones / N. Kumar, D. Gaur, D.C. Masison, D. Sharma // *G3 (Bethesda)*. – 2014. – V. 4, N 3. – P. 461–470.
92. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

93. Larkindale J. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance / J. Larkindale, J.D. Hall, M.R. Knight, E. Vierling // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 138, N 2. – P. 882–897.
94. Larkindale J. Core genome responses involved in acclimation to high temperature / J. Larkindale, E. Vierling // *Plant Physiol.* – 2008. V. 146, N 2. – P. 748–761.
95. Lee B.H. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 / B.H. Lee, D.A. Henderson, J.K. Zhu // *Plant Cell.* – 2005. – V. 17, N 11. – P. 3155–75.
96. Li Z. MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis* / Z. Li, H. Yue, D. Xing // *New Phytol.* – 2012. – V. 195, N 1. – P. 85–96.
97. Locato V. Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. / V. Locato, C. Gadaleta, L. De Gara, M.C. De Pinto // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31, N 11. – P. 1606–1619.
98. Logan D. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants / D. Logan, M.R. Knight // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 21–24.
99. Logan D.C. Having a swell time--mitochondrial morphology and plant cell death programmes / D.C. Logan // *J. Microsc.* – 2008. – V. 231, N 2. – P. 215–224.
100. Lohmann C. Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis* / C. Lohmann, G. Eggers-Schumacher, M. Wunderlich, F. Schoffl // *Mol. Genet. Genomics.* – 2004. – V. 271, N 1. – P. 11–21.
101. Longo V.D. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic

oxygen species in vivo / V.D. Longo, E.B. Gralla, J.S. Valentine // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271, N 21. – P. 12275–12280.

102. Ludovico P. Cytochrome *c* release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* / P. Ludovico, F. Rodrigues, A. Almeida [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2002. – V. 13, N 8. – P. 2598–2606.

103. Lowry O.H. Protein measurement with folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.

104. Machida K. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase in yeast / K. Machida, T. Tanaka // FEBS Lett. – 1999. – V. 462, N 1–2. – P. 108–112.

105. Mayer M.P. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism / M.P. Mayer, B. Bukau // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – V. 62, N 6. – P. 670–684.

106. Mayer M.P. Gymnastics of molecular chaperones / M.P. Mayer // Mol. Cell. – 2010. – V. 39, N 3. – P. 321–331.

107. Metacaspases / L. Tsiatsiani [et al.] // Cell Death Differ. – 2011. – V. 18, N 8. – P. 1279–88.

108. Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense / C. Gleason [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108, N 26. – P. 10768–10773.

109. Mitochondrial composition, function and stress response in plants / R.P. Jacoby [et al.] // J. Integr. Plant Biol. – 2012. – V. 54, N. 11. – P. 887–906.

110. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging / S. Marchi [et al.] // Signal Transduct. – 2012. – P. 329635.

111. Millar A.H. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / A.H. Millar, J. Whelan, K.L. Soole, D.A. Day // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2011. – V. 62. – P. 79–104.
112. Miller G. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? / G. Miller, R. Mittler // *Ann. Bot.* – 2006. – V. 98, N 2. – P. 279–288.
113. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7, N 9. – P. 405–10.
114. Mittler R. Reactive oxygen gene network of plants / R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9, N 10. – P. 490–8.
115. Mittler R. How do plants feel the heat? / R. Mittler, A. Finka, P. Goloubinoff // *Trends Biochem. Sci.* – 2012. – V. 37, N 3. – P. 118–125.
116. Moraitis C. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / C. Moraitis, B.P. Curran // *Yeast.* – 2004. – V. 21, N 4. – P. 313–323.
117. Morano K.A. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* / K.A. Morano, C.M. Grant, W.S. Moye-Rowley // *Genetics.* – 2012. – V. 190, N 4. – P. 1157–95.
118. Morphological classification of plant cell deaths / W.G. van Doorn [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2011. – V. 18, N 8. – P. 1241–1246.
119. Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I.M. Møller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
120. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // *Physiologia Plantarum.* – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
121. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // *Biochem. J.* – 2009. – V. 417, N 1. – P. 1–13.

122. Nakamoto H. The small heat shock proteins and their clients / H. Nakamoto, L. Vigh // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. – V. 64, N 3. – P. 294–306.
123. Nargund A.M. Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae* / A.M. Nargund, S.V. Avery, J.E. Houghton // *Apoptosis.* – 2008. – V. 13, N 6. – P. 811–821.
124. Naton B. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells / B. Naton, K. Hahlbrock, E. Schmelzer // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 112. – P. 433–444.
125. *nde1* deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants / F. Gomes [et al.] // *Biochem. J.* – 2013. – V. 449, N 3. – P. 595–603.
126. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture / E.G. Rikhvanov [et al.] // *Plant J.* – 2007. – V. 52. – P. 763–778.
127. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice / Y. Qi [et al.] // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585, N 1. – P. 231–239.
128. Park H.G. Cellular responses to mild heat stress / H.G. Park, S.I. Han, S.Y. Oh, H.S. Kang // *Cell Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62, N 1. – P. 10–23.
129. Phosphate and succinate use different mechanisms to inhibit sugar-induced cell death in yeast: insight into the Crabtree effect / Y.J. Lee [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, N 23. – P. 20267–20274.
130. Phosphoinositide-specific phospholipase C9 is involved in the thermotolerance of Arabidopsis / S.Z. Zheng [et al.] // *Plant J.* – 2012. – V. 69. – P. 689–700.
131. Piper P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / P.W. Piper // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – V. 11, N 4. – P. 339–355.
132. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death / A. Vianello [et al.] // *Physiologia Plantarum.* – 2007. – V. 129. – P. 242–252.

133. Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance / A. Finka [et al.] // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24, N 8. – P. 3333–48.

134. Pnueli L. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants / L. Pnueli, H. Liang, M. Rozenberg, R. Mittler // *Plant J*. – 2003. – V. 34, N 2. – P. 187–203.

135. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells / R.A. Vacca [et al.] // *Plant Physiol*. – 2004. – V. 134. – P. 1100–1112.

136. Pulsing of membrane potential in individual mitochondria: a stress-induced mechanism to regulate respiratory bioenergetics in *Arabidopsis* / M. Schwärzlander [et al.] // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24, N 3. – P. 1188–1201.

137. Queitsch C. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis* / C. Queitsch, S.W. Hong, E. Vierling, S. Lindquist // *Plant Cell*. – 2000. – V. 12. – P. 479–492.

138. Rasmussen A.K. Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* / A.K. Rasmussen, A. Chatterjee, L.J. Rasmussen [et al.] // *Nucleic. Acids Res*. – 2003. – V. 31, N 14. – P. 3909–3917.

139. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / L.A. del Río [et al.] // *Plant Physiol*. – 2006. – V. 141, N 2. – P.330–5.

140. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria / N. Navrot [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2007. – V. 129. – P. 185–195.

141. Reape T.J. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes / T.J. Reape, E.M. Molony, P.F. McCabe // *J. Exp. Bot*. – 2008. – V. 59. – P. 435–444.

142. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling / Y. Pan [et al.] // *Cell Metab.* – 2011. – V. 13, N 6. – P. 668–678.
143. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation / J.M. Suski [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 810. – P. 183–205.
144. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling / N. Suzuki [et al.] // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2011. – V. 14, N 6. – P. 691–9.
145. Rhoads D.M. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / D.M. Rhoads, A.L. Umbach, C.C. Subbaiah, J.N. Siedow // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 357–366.
146. Rigoulet M. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling / M. Rigoulet, E.D. Yoboue, A. Devin // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – V. 14, N 3. – P. 459 – 468.
147. Rikhvanov E.G. Chaperone effects on prion and nonprion aggregates / E.G. Rikhvanov, N.V. Romanova, Y.O Chernoff // *Prion.* – 2007. – V. 4. – P. 217–222.
148. Roberts T.H. Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria / T.H. Roberts, K.M. Fredlund, I.M. Moller // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 373, N 3. – P. 307–9.
149. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast / A.I. Pozniakovsky [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2005. – V. 168. – P. 257–269.
150. Sagi M. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases / M. Sagi, R. Fluhr // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 336–340.
151. Saidi Y. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance / Y. Saidi, A. Finka, P. Goloubinoff // *New Phytol.* – 2011. – V. 190. – P. 556–565.

152. Sakurai H. Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression / H. Sakurai, Y. Enoki // FEBS J. – 2010. – V. 277. – P. 4140–4149.
153. Schwarzländer M. Monitoring the *in vivo* redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge / M. Schwarzländer, M.D. Fricker, L.J. Sweetlove // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787, N 5. – P. 468–75.
154. Scott I. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis / I. Scott, D.C. Logan // New Phytol. – 2008. – V. 177, N 1. – P. 90–101.
155. Simeonova E. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence / E. Simeonova, M. Garstka, J. Koziol-Lipinska, A. Mostowska // Protoplasma. – 2004. – V. 223. – P. 143–153.
156. Singh A. Genome-wide analysis of rice ClpB/HSP100, ClpC and ClpD genes / A. Singh, U. Singh, D. Mittal, A. Grover // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 95.
157. Sipos I. Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals / I. Sipos, L. Tretter, V. Adam-Vizi // J. Neurochem. – 2003. – V. 84, N 1. – P. 112 – 8.
158. Skulachev V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics / V.P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – V. 1363, N 2. – P. 100–124.
159. Skulachev V.P. Programmed death phenomena: from organelle to organism / V.P. Skulachev // Ann. NY Acad. Sci. – 2002. – V. 959. – P. 214–37.
160. Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation / M. Miot [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108, N 17. – P. 6915–6920.

161. Sreedhar A.S. Activation of stress response by ionomycin in rat hepatoma cells / A.S. Sreedhar, U.K. Srinivas // *J. Cell Biochem.* – 2002. – V. 86, N 1. – P. 154–161.
162. Starkov A.A. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax / A.A. Starkov, B.M. Polster, G. Fiskum // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 83, N 1. – P. 220–8.
163. Su P.H. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into Pea and *Arabidopsis* chloroplasts / P.H. Su, H.M. Li // *Plant Cell.* – 2010. – V. 22, N 5. – P. 1516–1531.
164. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat / Y.L. Ruan [et al.] // *Mol. Plant.* – 2010. – V. 3, N 6. – P. 942–55.
165. Sugiyama K. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae* / K. Sugiyama, A. Kawamura, S. Izawa, Y. Inoue // *Biochem. J.* – 2000. – V. 352, N 1. – P. 71–78.
166. Suzuki N. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction / N. Suzuki, R. Mittler // *Physiologia Plantarum.* – 2006. – V. 126. – P. 45–51.
167. Suzuki N. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki, S. Koussevitzky, R. Mittler, G. Miller // *Plant Cell Environ.* – 2012. – V. 35, N 2. – P. 259–70.
168. Swidzinski J.A. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / J.A. Swidzinski, L.J. Sweetlove, C.J. Leaver // *Plant J.* – 2002. – V. 30, N 4. – P. 431–46.
169. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphorylation / Y. Ogasawara [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283, N 14. – P. 8885–92.
170. Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling relationship in plant cells / G. Loro [et al.] // *Plant J.* – 2012. – V. 71, N 1. – P. 1–13.

171. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants / N. Suzuki [et al.] // *Plant Cell*. – 2013. – V. 25, N 9. – P. 3553–69.
172. The 26S proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress / A. Nishizawa-Yokoi [et al.] // *Plant Cell Physiol*. – 2010. – V. 51, N 3. – P. 486–496.
173. The *Arabidopsis* J-protein AtDjB1 facilitates thermotolerance by protecting cells against heat-induced oxidative damage / W. Zhou [et al.] // *New Phytol*. – 2012. – V. 194, N 2. – P. 364–78.
174. The hyperfluidization of mammalian cell membrane acts as a signal to initiate the heat shock protein response / G. Balogh [et al.] // *FEBS J*. – 2005. – V. 272. – P. 6077–6086.
175. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli / G. Miller [et al.] // *Sci. Signal*. – 2009. – V. 2, N 84. – P. 45.
176. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties / M. Siddique [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2008. – V. 13, N 2. – P. 183–197.
177. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains / Y. Zhang [et al.] // *Autophagy*. – 2007. – V. 3, N 4. – P. 337 – 346.
178. The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria / V. Casolo [et al.] // *FEBS Lett*. – 2000. – V. 474, N 1. – P. 53–57.
179. Tissieres A. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs / A. Tissieres, H.K. Mitchell, U.M. Tracy // *Mol. Biol*. – 1974. – V. 84, N 3. – P. 389–98.
180. Torres M.A. ROS in biotic interactions / M.A. Torres // *Physiol. Plant*. – 2010. – V. 138, N 4. – P. 414–29.

181. Traba J. Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier / J. Traba, J. Satrustegui, A. del Arco // *Mitochondrion*. – 2009. – V. 9, N 2. – P. 79–85.
182. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens // *J. Physiol.* – 2003. – V. 552, N 2. – P. 335–344.
183. Tzagoloff A. Genetics of mitochondrial biogenesis / A. Tzagoloff, A.M. Myers // *Annu. Rev. Biochem.* – 1986. – V. 55. – P. 249–285.
184. Vierling E. The roles of heat-shock proteins in plants / E. Vierling // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1991. – V. 42. – P. 579–620.
185. Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining / G. Szilagyi [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2006. – V. 399, N 3. – P. 206–9.
186. Volkov R.A. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* / R.A. Volkov, I.I. Panchuk, P.M. Mullineaux, F. Schoffl // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – V. 61, N 4–5. – P. 733–746.
187. Wahid A. Heat tolerance in plants: an overview / A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M. R. Foolad // *Environ. Exp. Bot.* – 2007. – V. 61. – P. 199–223.
188. Wang W. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response / W. Wang, B. Vinocur, O. Shoseyov, A. Altman // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9, N 5. – P. 244–252.
189. Wang C. The role of mitochondria in apoptosis / C. Wang, R.J. Youle // *Annu. Rev. Genet.* – 2009. – V. 43. – P. 95–118.
190. Wang K. Heat shock proteins in relation to heat stress tolerance of creeping Bentgrass at different N levels / K. Wang, X. Zhang, M. Goatley, E. Ervin // *PLoS. One.* – 2014. – V. 9, N 7. – P. 102914.
191. Weir I.E. Oxidative stress is generated via the mitochondrial respiratory chain during plant cell apoptosis / I.E. Weir, N.A. Pham, D.W. Hedley // *Cytometry A.* – 2003. – V. 54, N 2. – P. 109–117.

192. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death / I.V. Lyubushkina [et al.] // *Protoplasma*. – 2014. – V. 251, N 3. – P. 615–23.
193. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species / F. Minibayeva [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2009. – V. 32, N 5. – P. 497–508.
194. Xu J. Overexpression of GmHsp90s, a heat shock protein 90 (Hsp90) gene family cloning from soybean, decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* / J. Xu [et al.] // *PLoS. One.* – 2013. – V. 8, N 7. – P. 69810.
195. Xue G.P. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes / G.P. Xue, S. Sadat, J. Drenth, C.L. McIntyre // *Exp. Bot.* – 2014. – V. 65, N 2. – P. 539–57.
196. Yamori W. Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method / W. Yamori, H. Kogami, T. Masuzawa // *Polar. Biosci.* – 2005. – V. 18. – P. 73–81.
197. Yao N. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / N. Yao, B.J. Eisfelder, J. Marvin, J.T. Greenberg // *Plant J.* – 2004. – V. 40, N 4. – P. 596–610.
198. Yao N. *Arabidopsis* ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death / N. Yao, J.T. Greenberg // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18, N 2. – P. 397 – 411.
199. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging / W. Li [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – V. 17, N 4. – P. 1802–1811.
200. Zhang L. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that *HsfA2* alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis* / L. Zhang, Y. Li, D. Xing, C. Gao // *J. Exp. Bot.* – 2009. – V. 60, N 7. – P. 2073–2091.

201. Zhong M. Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor / M. Zhong, A. Orosz, C. Wu // Mol. Cell. – 1998. – V. 2, N 1. – P. 101–108.