



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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск-2015

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент **Побежимова Тамара Павловна**

Официальные оппоненты:

Тимофеев Максим Анатольевич, доктор биологических наук; директор научно-исследовательского института биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет»; заведующий лабораторией «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ»; профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО «ИГУ»

Шпаковский Георгий Вячеславович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), заведующий лабораторией механизмов геномной экспрессии

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «17» июня 2015 г. в 9⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru; веб-сайт: <http://www.sifibr.irk.ru/>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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). 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 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; Rigoulet et al., 2011).

Установлено, что при тепловом воздействии в образовании АФК принимают участие митохондрии (Schwarzlander et al., 2012). Однако вклад митохондрий в продукцию АФК, а также механизм митохондриальной продукции АФК при тепловом воздействии остается во многом неизвестным.

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 (гиперполяризация), в результате чего компоненты дыхательной цепи перевосстанавливаются (Skulachev, 1998). Поскольку повышение генерации АФК митохондриями отмечается в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии (Zhang et al., 2009; Рихванов и др., 2014), 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 растений 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 суспензионную культуру озимой пшеницы, тростника и клетки дрожжей.

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 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 6 статей в рецензируемых изданиях, 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали суспензионные культуры озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорта Иркутская) и сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L., сорта РОJ2878, линия, устойчивая к аноксии), полученную в ИФР РАН и предоставленную к.б.н. В.Н. Шмаковым. Культуры выращивали в темноте при 26 °С на среде Мурасиге–Скуга (Murashige, Scoog, 1962). Для экспериментов использовали клетки суспензионных культур в экспоненциальной фазе роста. В работе также использовали штамм родительского типа *Saccharomyces cerevisiae* W303-1В (*MATa ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1 [rho⁺]*), любезно предоставленный L. 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. 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 и использовали в логарифмической фазе роста.

Методы исследования. Для определения изменения изучаемых процессов, происходящих в клетках при тепловых воздействиях, культуры клеток растений и дрожжей подвергались воздействию температурами: 37, 42,

45, 50, 55, 60 °C в течение 0–90 мин. В работе была использована обработка низкими отрицательными температурами культуры клеток озимой пшеницы (–8 °C, 1 ч) и сахарного тростника (–8 °C, 2 ч).

При исследовании влияния температурных воздействий на изучаемые параметры 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».

Жизнеспособность клеток культур растений после теплового воздействия оценивали методом двойного окрашивания с использованием флуоресцентных красителей: флуоресцеин диацетата (FDA) в конечной концентрации 50 мкМ и пропидий йодида (PI) в конечной концентрации 7,5 мкМ. Определение жизнеспособности дрожжей *S. cerevisiae* проводили по подсчету колониеобразующих единиц (КОЕ).

Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата – H₂DCF•DA.

Изменение митохондриального мембранного потенциала определяли с использованием ратиометрического катионного флуоресцентного красителя 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид – JC-1 (Simeonova et al., 2004) в клетках растений, «MitoTracker Orange CMTMRos» – МО в клетках дрожжей. Изменение интенсивности флуоресценции H₂DCF•DA оценивали в зеленом канале, JC-1 и МО – в красном канале и выражали в процентах от контроля или в относительных единицах.

Выделение суммарного белка проводили, как описано в работе (Rikhvanov et al., 2007). Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1957).

Электрофорез белков в ПААГе с ДДС-Na проводили в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», США) и обработку антителами проводили в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя.

В работе приведены средние арифметические и их стандартные ошибки. В работе был использован коэффициент корреляции Пирсона, расчет которого проводился в программе SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток растений

Тепловое воздействие приводит к повышению содержания АФК и гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны в клетках культуры озимой пшеницы

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 (Гарифзянов и др., 2011; Креславский и др., 2012).

При изучении изменения содержания АФК в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии показано, что интенсивность флуоресценции DCF при 26 °С была минимальна, однако действие повышенной температуры (45 °С, 30 мин) на клетки приводило к значительному увеличению флуоресценции данного красителя (рис. 1 А, В). В качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно, использовали антиоксидант – аскорбиновую кислоту и источник АФК – пероксид водорода (H_2O_2). Добавление аскорбиновой кислоты при тепловом воздействии подавляло повышение флуоресценции DCF. Наоборот, добавление H_2O_2 к клеткам, инкубируемым при 26 °С, повышало флуоресценцию (рис. 1 В).

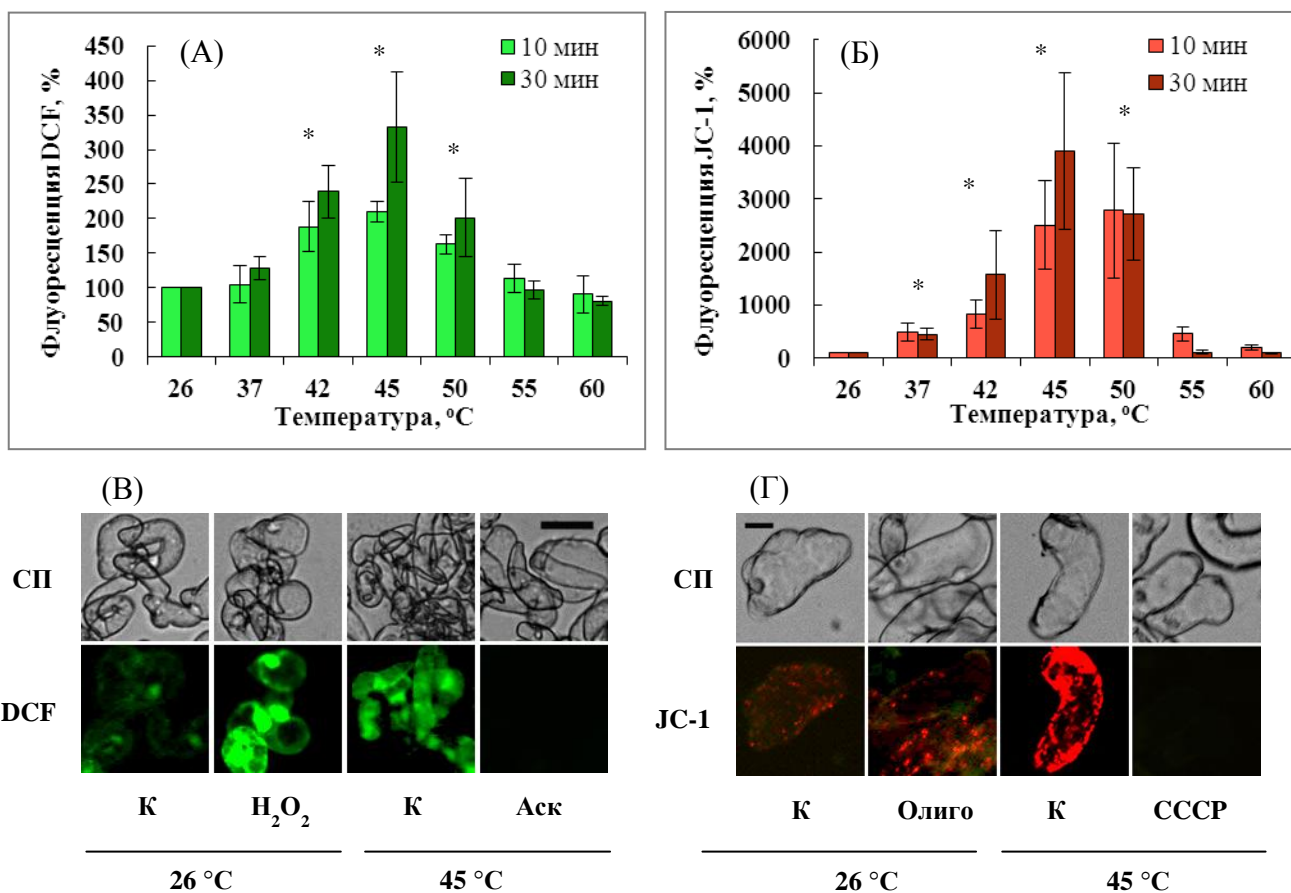


Рис. 1. Изменение содержания АФК и МП при тепловом воздействии различной интенсивности в культуре клеток *T. aestivum*.

Количественный анализ интенсивности флуоресценции 1 мкМ DCF (А) и 10 мкМ JC-1 (Б). За 100% принимали флуоресценцию при 26 °С (К). Микрофотографии клеток озимой пшеницы после обработки 50 мкМ H_2O_2 и 100 мМ аскорбиновой кислотой, Аск (В); 30 мкМ олигомицина, Олиго и 4 мкМ СССР (Г). СП – светлое поле. Масштабный отрезок: 50 мкм (В) и 20 мкм (Г). n=3. M±S.E. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Необходимо было установить, как повлияют температурные обработки: 37, 42, 45, 50, 55 и 60 °С на изменение уровня АФК в клетках озимой пшеницы. Инкубация клеток культуры озимой пшеницы в диапазоне температур от 42 до 50 °С приводила к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции

DCF по сравнению с контролем (26 °С). Интенсивность флуоресценции при более высоких температурах, таких как 55 и 60 °С (рис. 1 А), не отличалась от контрольных значений. Следует также отметить, что более длительное тепловое воздействие (30 мин) приводило, как правило, к более интенсивной флуоресценции красителя, чем короткое (10 мин). Таким образом, способность клеток озимой пшеницы образовывать АФК при тепловых воздействиях наблюдается только в определенном диапазоне температур.

Известно, что у клеток табака и арабидопсиса при тепловом воздействии в образовании АФК принимают участие митохондрии (Vacca et al., 2004; Zhang et al., 2009). Изменение митохондриального потенциала при тепловом воздействии в культуре озимой пшеницы определяли, используя флуоресцентный краситель JC-1. Интенсивность флуоресценции JC-1 в клетках озимой пшеницы при 26 °С была незначительной. Тепловая обработка приводила к резкому увеличению флуоресценции (рис. 1 Б, Г). Способность СССР и олигомицина, соответственно, ингибировать и повышать флуоресценцию указывает, что изменение флуоресценции JC-1 соответствует изменению МП (рис. 1 Г).

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.

Тепловое воздействие в диапазоне температур 37–50 °С повышало флуоресценцию JC-1. Увеличения флуоресценции JC-1 не происходило, если температуру теплового воздействия повышали до 55 и 60 °С (рис. 1 Б). Достоверных различий по флуоресценции красителя в культуре клеток озимой пшеницы в зависимости от времени теплового воздействия (10 и 30 мин) не обнаружено (рис. 1 Б).

Таким образом, повышение температуры приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и усилению продукции АФК в клетках озимой пшеницы. Однако повышение МП и продукции АФК наблюдается в определенном температурном диапазоне (МП: от 37 до 50 °С; АФК: от 42 до 50 °С). В случае превышения этого диапазона не наблюдается ни гиперполяризации, ни усиления продукции АФК.

Изменение жизнеспособности клеток озимой пшеницы при действии повышенных температур

Тепловое воздействие на клетки озимой пшеницы приводит к увеличению продукции АФК. Повышенный уровень АФК в клетке может вызывать ее гибель. В связи с этим определяли жизнеспособность клеток культуры при тепловом воздействии различной интенсивности.

Как показано на рис. 2 А, Б, мягкое тепловое воздействие (37 и 42 °С) практически не влияет на жизнеспособность клеток озимой пшеницы. Умеренное тепловое воздействие (45 и 50 °С) приводит к развитию «отсроченной» гибели клеток. Сразу же после воздействия температурой 50 °С (10 мин) практически все клетки были живыми, а после восстановительного

периода погибало около 70% клеток. Жесткое тепловое воздействие (55, 60 °С) приводило к значительной гибели клеток сразу же после обработки. Таким образом, при воздействии температурами 45 и 50 °С гибель клеток озимой пшеницы развивается во времени, что указывает на активный характер гибели.

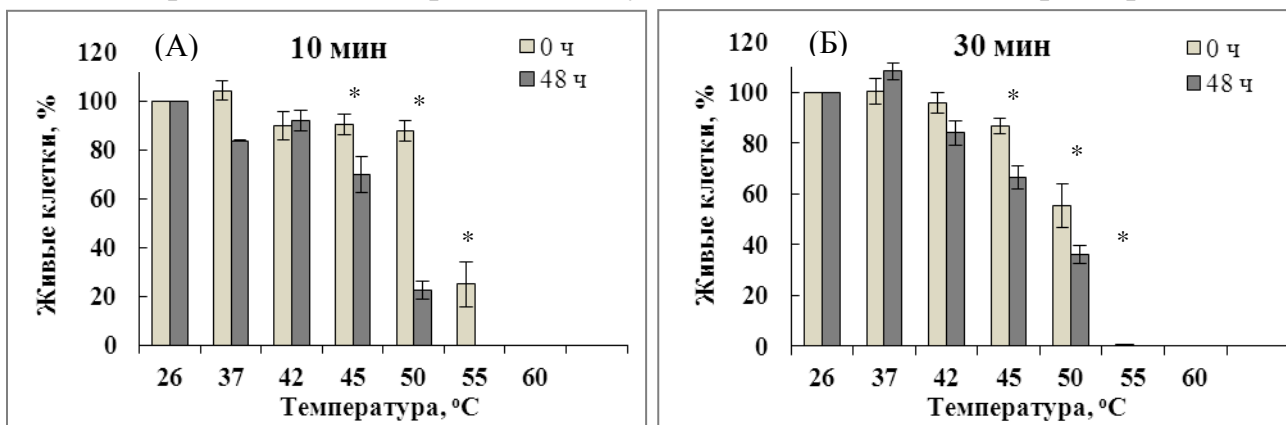


Рис. 2. Жизнеспособность клеток культуры *T. aestivum* сразу и через 48 ч после теплового воздействия различной интенсивности.

Культура клеток, обработанная в течение 10 мин (А); в течение 30 мин (Б). Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ). За 100% принимали количество живых клеток в контроле (26 °С). n=3. M±S.E. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Тепловое воздействие приводит к повышению содержания АФК и гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны в клетках культуры сахарного тростника

При изучении влияния повышенных температур на продукцию АФК и изменение МП в клетках культуры сахарного тростника было показано, что при тепловом воздействии 10 и 30 мин в диапазоне температур от 37 до 55 °С происходило значительное повышение уровня АФК (рис. 3 А). При 60 °С уровень АФК был как и в контроле. Следует отметить, что температурные диапазоны при которых наблюдается образование АФК у озимой пшеницы и сахарного тростника различаются. У пшеницы образование АФК происходит при тепловом воздействии от 42 до 50 °С, у тростника от 37 до 55 °С. Различия в продукции АФК в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника указывают, что ответная реакция на тепловое воздействие у этих видов существенно отличается.

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 было показано, что тепловая обработка в течение 10 мин при 45–55 °С приводила к повышению МП (рис. 3 Б), так же как и в культуре клеток озимой пшеницы при воздействии температур 45, 50 °С (рис. 1 Б). В отличие от культуры клеток пшеницы (рис. 1 Б) обработка в течение 30 мин в диапазоне температур от 45 до 55 °С клеток сахарного тростника не вызывала повышения МП. Напротив, в этих условиях, как правило, наблюдалось снижение МП ниже контрольного уровня.

Таким образом, в культуре сахарного тростника кратковременные воздействия (10 мин) приводят к гиперполяризации митохондриальной мембраны, которая при длительном тепловом воздействии (30 мин) сменяется деполяризацией.

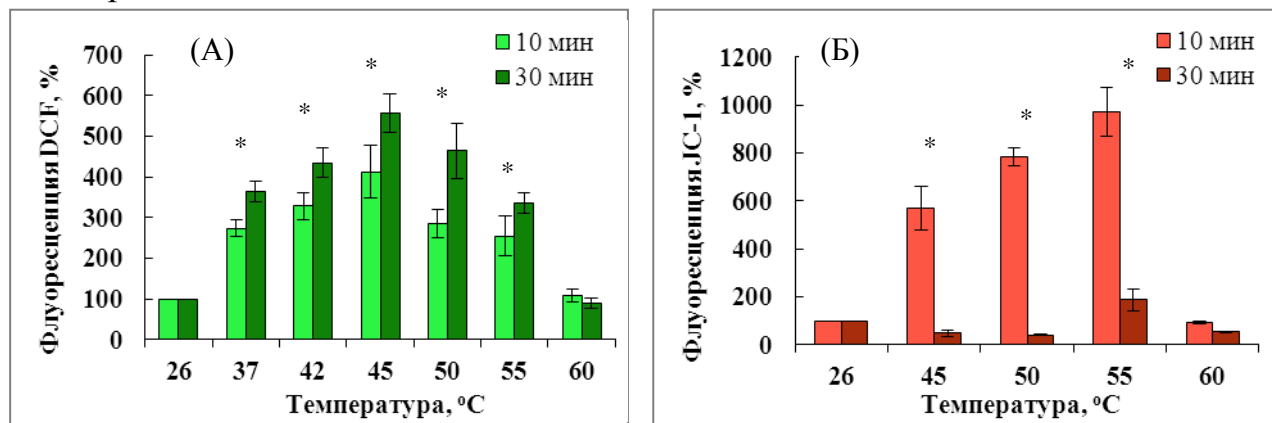


Рис. 3. Изменение содержания АФК (А) и МП (Б) при тепловом воздействии различной интенсивности в культуре клеток *S. officinarum*. Количественный анализ интенсивности флуоресценции 1 мкМ DCF (А) и 10 мкМ JC-1 (Б). За 100% принимали флуоресценцию контрольной культуры (26 °C). n=3. M±S.E. * – различия достоверны при уровне значимости p≤0,05.

Изменение жизнеспособности клеток сахарного тростника при действии повышенных температур

Изучение динамики гибели клеток сахарного тростника показало, что обработка при температурах 45 и 50 °C (10 и 30 мин) приводила к развитию отсроченной гибели клеток (рис. 4). Тепловое воздействие при более высоких

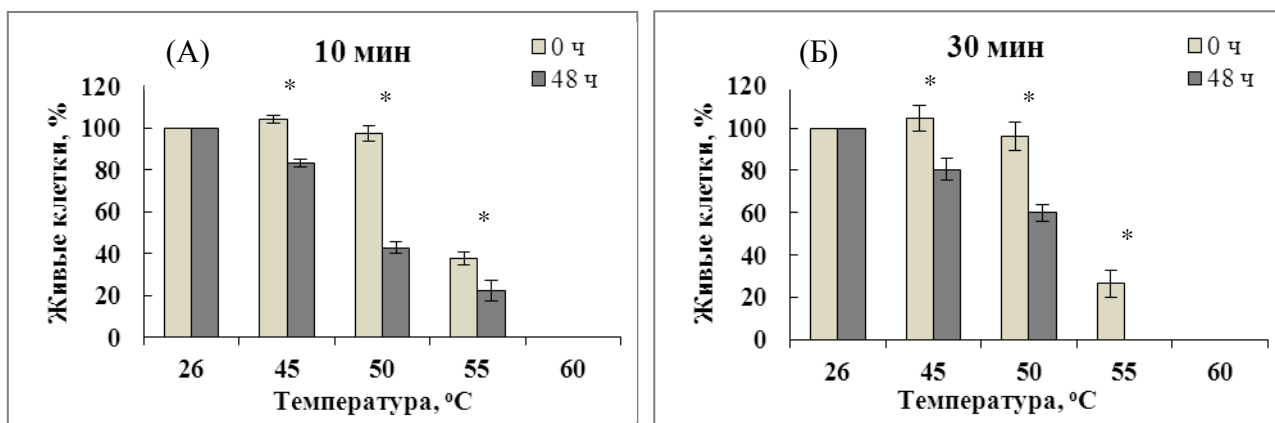


Рис. 4. Жизнеспособность клеток культуры *S. officinarum* сразу и через 48 ч после теплового воздействия различной интенсивности. Культура клеток, инкубированная при тепловых воздействиях в течение 10 мин (А); в течение 30 мин (Б). Живые клетки окрашивали FDA (50 мкМ), а мертвые клетки – PI (7,5 мкМ). За 100% принимали количество живых клеток в контроле (26 °C). n=3. M±S.E. * – различия достоверны при уровне значимости p≤0,05.

температурах (55, 60 °C) приводило к мгновенной гибели большинства клеток сразу же после теплового воздействия.

Таким образом, температурная обработка при 45 до 50 °С приводит к развитию отсроченной гибели клеток сахарного тростника.

Корреляция между увеличением генерации АФК и повышением митохондриального потенциала при тепловом воздействии в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника

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 показать, что данное явление наблюдается в клетках растений при тепловом воздействии, сравнили интенсивность флуоресценции DCF и JC-1 (рис. 5) после инкубации при повышенных температурах в течение 10 и 30 мин.

В клетках озимой пшеницы наблюдалась высокая корреляционная зависимость между флуоресценцией DCF и JC-1. После 10 мин теплового воздействия коэффициент корреляции составлял 0,73, а после 30 мин – 0,94. 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 в культуре клеток сахарного тростника показало, что так же как и в клетках озимой пшеницы, после 10 мин теплового воздействия наблюдается корреляция между этими показателями, коэффициент корреляции составил 0,67 (рис. 5 А). В то же время после 30 мин воздействия корреляция между АФК и МП отсутствовала, коэффициент корреляции составил –0,19 (рис. 5 Б).

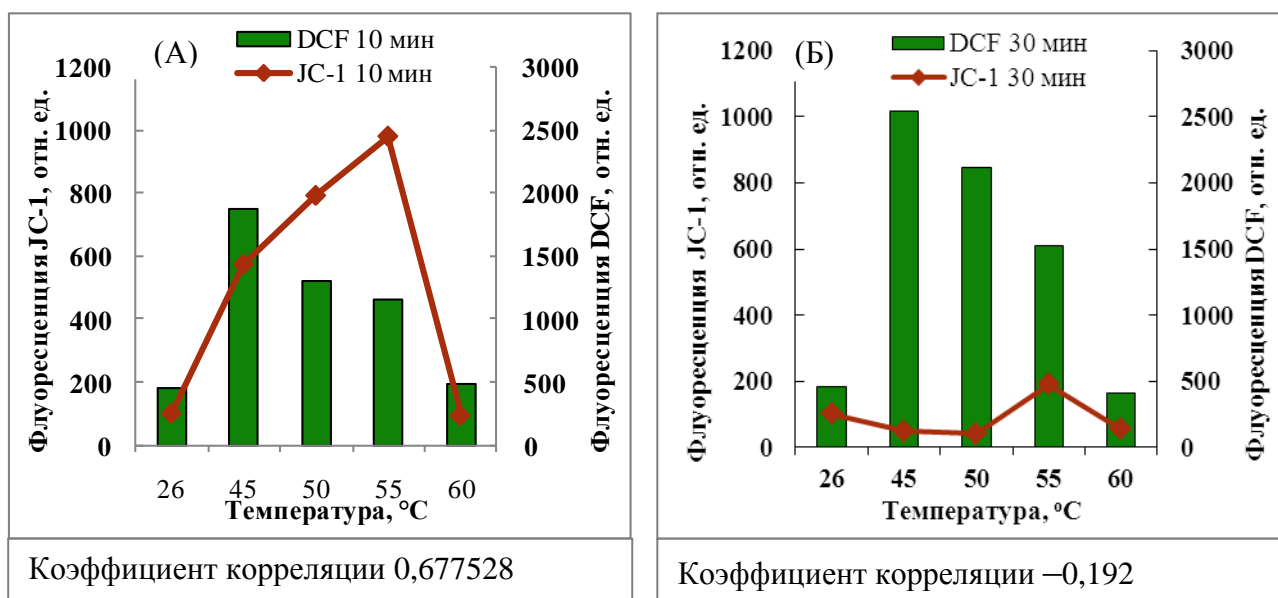


Рис. 5. Сравнение интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF в клетках культуры *S. officinarum* после теплового воздействия 10 (А) и 30 мин (Б).

Очевидно, гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны наблюдается на ранней фазе теплового воздействия, которая затем сменяется

деполяризацией. Длительность фазы гиперполяризации и деполяризации различается у разных видов растений.

Протонофор CCCP деполяризует митохондриальную мембрану и ингибирует генерацию АФК в клетках озимой пшеницы

С целью выяснения причинно-следственной связи между повышением МП и АФК в клетках растений использовали протонофор CCCP. Как показано на рис. 6, тепловое воздействие вызывало усиление продукции АФК, а добавление CCCP ингибировало этот процесс. Аналогичным образом CCCP подавлял образование АФК в контрольных условиях (рис. 6). Таким образом, протонофор CCCP, снижая митохондриальный потенциал, подавляет продукцию АФК при тепловом воздействии.

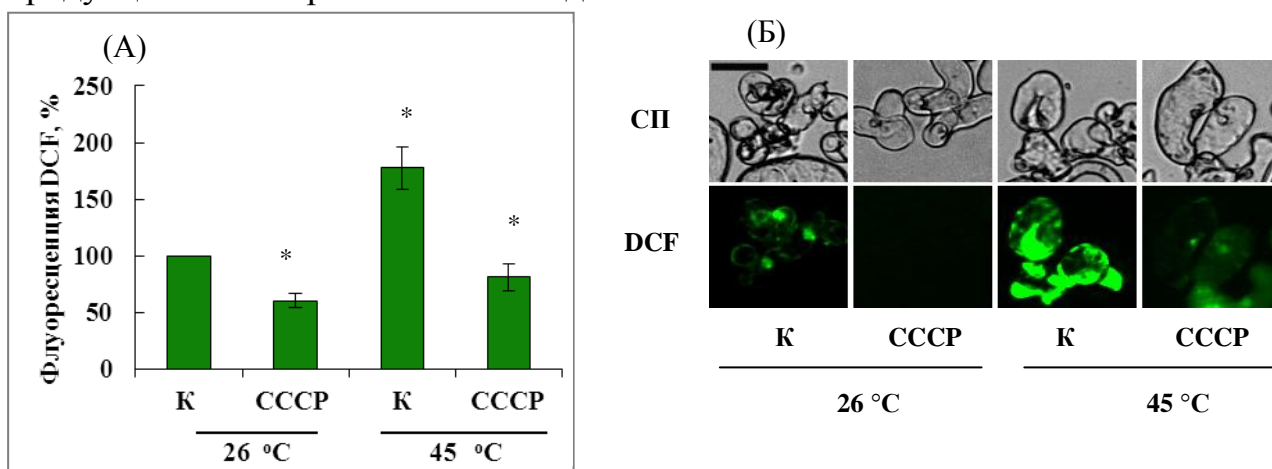


Рис. 6. Эффект CCCP на содержание АФК в культуре клеток озимой пшеницы при тепловом воздействии.

А – количественный анализ флуоресценции DCF при 45 °С, 30 мин. За 100% принимали флуоресценцию клеток при 26 °С. Б – микрофотографии клеток с флуоресценцией DCF. К – интенсивность флуоресценции в отсутствие CCCP; СССР – интенсивность флуоресценции в присутствии 4 мкМ CCCP. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. n=3. М±S.E. * – различия достоверны при уровне значимости p≤0,05.

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). К повышению ионов кальция в цитозоле может приводить тепловое воздействие (Saidi et al., 2011). Поэтому необходимо было изучить влияние хелатора кальция – ЭГТА и блокатора кальциевых каналов хлорида лантана – LaCl₃ на повышение МП и содержание АФК в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии.

В соответствии с ранее полученными результатами (рис. 1) тепловое воздействие при 45 °С приводило к увеличению МП и усилению продукции АФК в клетках пшеницы.

Инкубация клеток в присутствии ЭГТА подавляла повышение МП при тепловом воздействии 45 °С (рис. 7 А). Аналогичный эффект ЭГТА наблюдался на продукцию АФК (рис. 7 Б). Подобный эффект был получен при инкубации

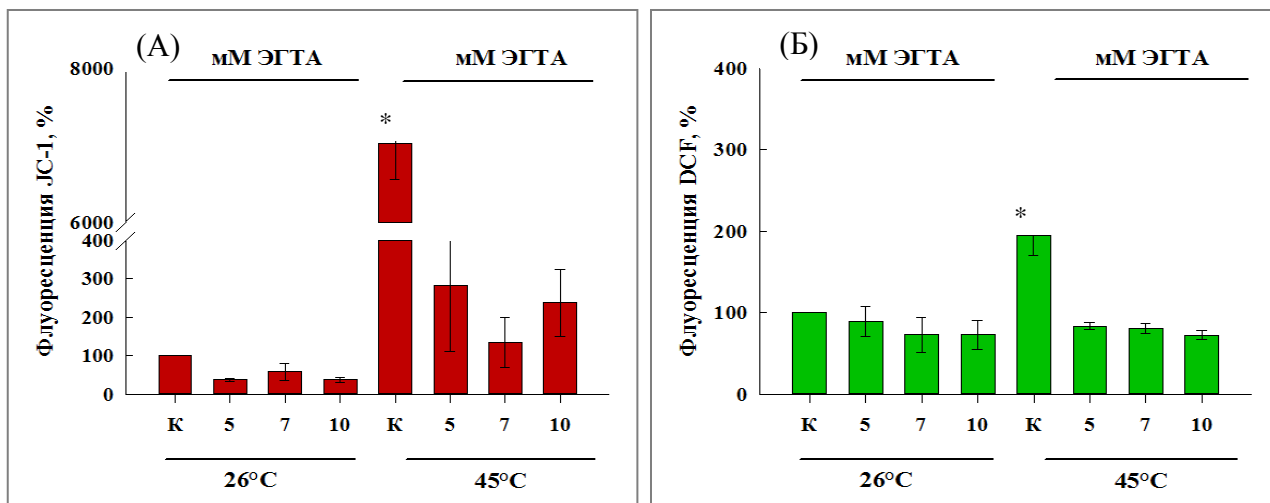


Рис. 7. Эффект ЭГТА на МП (А) и продукцию АФК (Б) в культуре клеток озимой пшеницы.

Культуру клеток обрабатывали при 45 °С (30 мин) в присутствии ЭГТА. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 (А) и DCF (Б). За 100% принимали флуоресценцию клеток при 26 °С (К). n=3. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

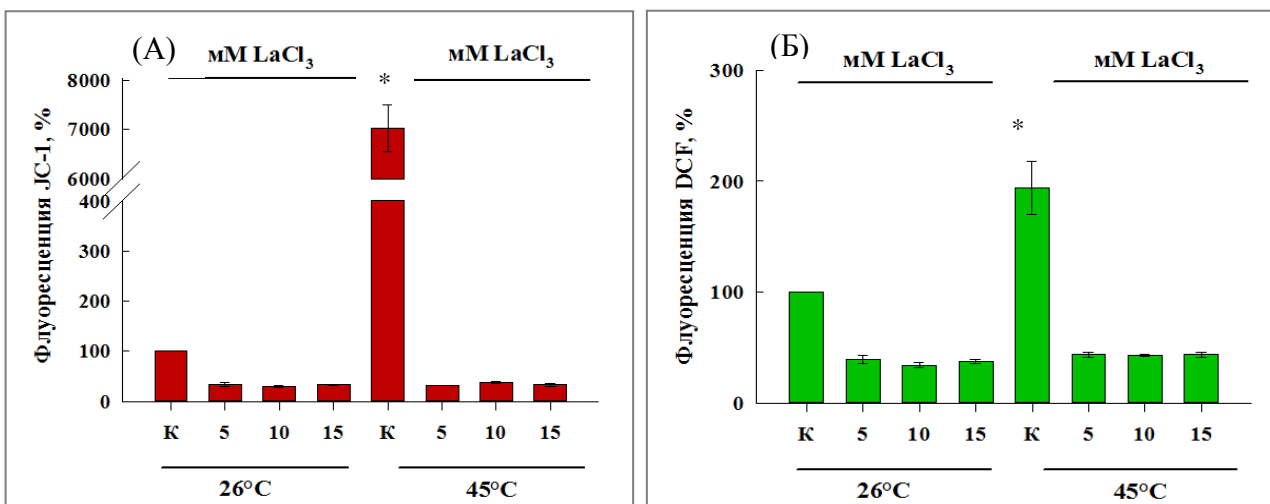


Рис. 8. Эффект LaCl_3 на МП (А) и продукцию АФК (Б) в культуре клеток озимой пшеницы.

Культуру клеток обрабатывали при 45 °С (30 мин) в присутствии LaCl_3 . Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 (А) и DCF (Б). За 100% принимали флуоресценцию клеток при 26 °С (К). n=3. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

клеток в присутствии LaCl_3 . LaCl_3 подавлял повышение МП при тепловом воздействии $45\text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 8 А) и продукцию АФК (рис. 8 Б).

Таким образом, действие ЭГТА и 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.

Холодовое воздействие приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и повышению содержания АФК в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника

Повышение генерации АФК происходило при холодовом воздействии в клетках озимой пшеницы (Lyubushkina et al., 2014). Как показано на рис. 9 А, при холодовом воздействии $-8\text{ }^\circ\text{C}$, 1 ч в клетках культуры озимой пшеницы наблюдалось повышение значения МП и увеличение АФК. Холодовое воздействие $-8\text{ }^\circ\text{C}$, 2 ч на культуру клеток сахарного тростника выявило сходную тенденцию и сопровождалось повышением МП и уровня АФК (рис. 9 Б).

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 клеток является универсальной на действие температурного стресса.

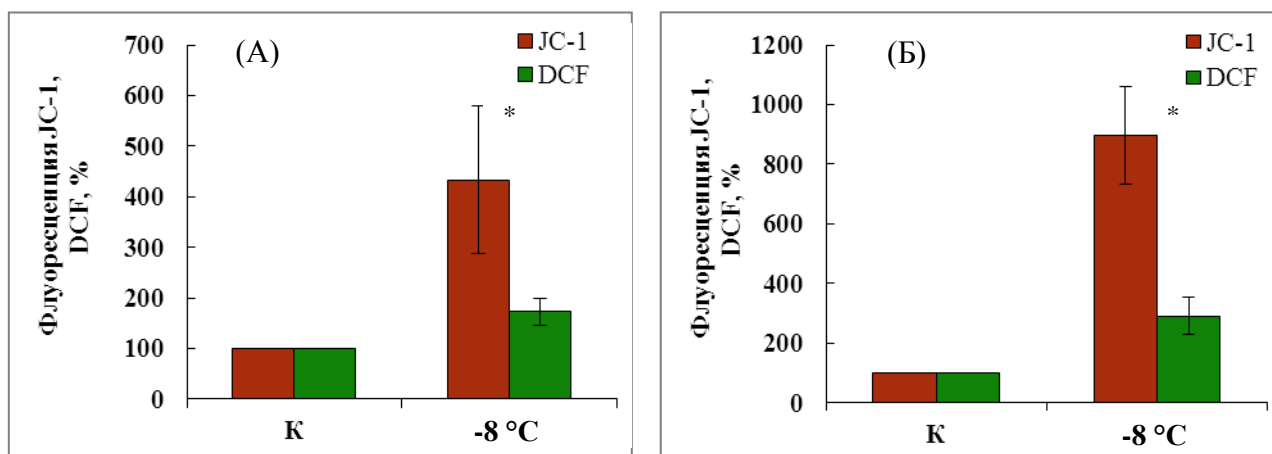


Рис. 9. Изменение уровня МП и содержания АФК при холодовом воздействии ($-8\text{ }^\circ\text{C}$, 1 ч) в клетках культуры озимой пшеницы (А) и сахарного тростника ($-8\text{ }^\circ\text{C}$, 2 ч) (Б). Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции JC-1 и DCF. За 100% принимали флуоресценцию клеток в контроле ($26\text{ }^\circ\text{C}$). $n=3$. $M \pm S.E.$ * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток дрожжей

Клетки дрожжей *S. 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.

Протонофор CCCP деполаризует митохондриальную мембрану и ингибирует генерацию АФК в клетках дрожжей

Ранее в наших работах было показано, что при тепловом воздействии увеличиваются потенциал на внутренней мембране митохондрий и содержание АФК в клетках дрожжей (Рихванов и др., 2014; Федосеева и др., 2014).

Необходимо было оценить влияние протонофоров на содержание АФК, изменение МП и жизнеспособность клеток дрожжей при тепловом воздействии. Как показано на рис. 10, протонофор CCCP в различных концентрациях (0,5; 1; 2 мкМ) подавлял повышение МП при тепловом воздействии. Одновременно CCCP снижал усиление генерации АФК, индуцируемое тепловой обработкой (рис. 10 А, Б). Следовательно, в клетках дрожжей при повышении температуры

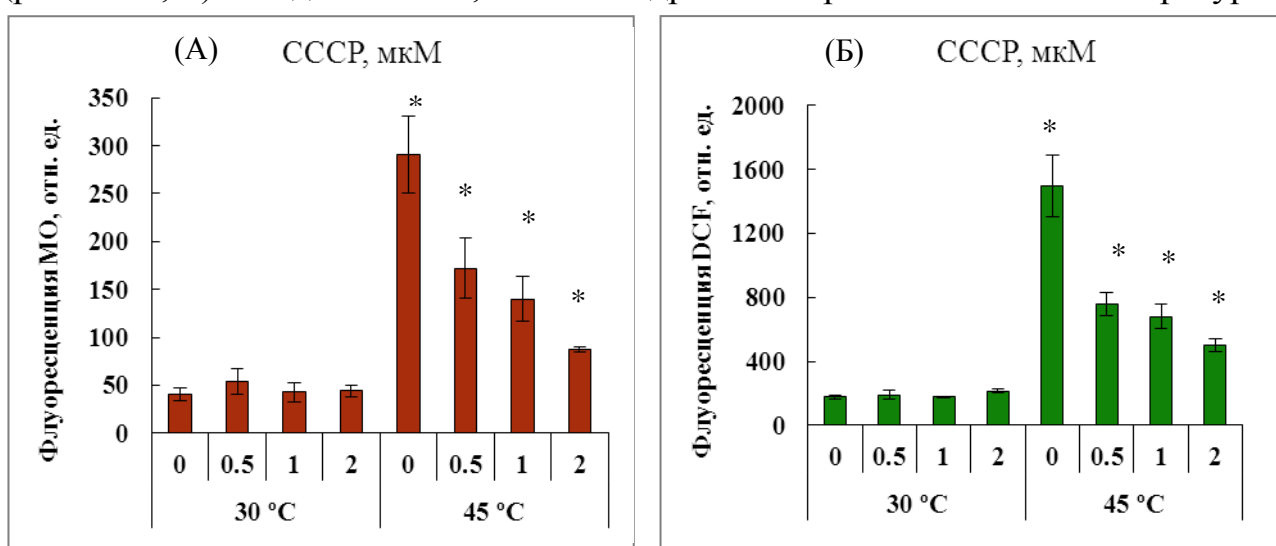


Рис. 10. Эффект CCCP на изменение МП (А) и продукцию АФК (Б) в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при 45 °С (30 мин).

Количественная оценка интенсивности флуоресценции 50 нМ MO (А) и 50 мкМ DCF (Б). Клетки обрабатывали 30 мин в присутствии CCCP при температурах 30 и 45 °С. n=3. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

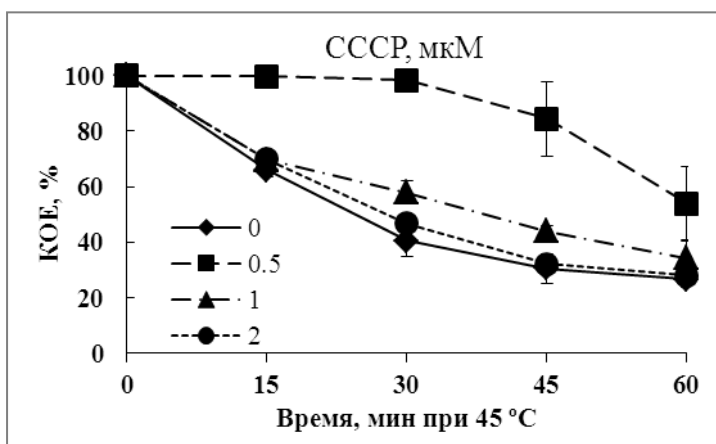


Рис. 11. Эффект CCCP на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* (W303–1В) при 45 °С. Жизнеспособность клеток определяли по количеству КОЕ. n=3. M±S.E.

СССР подавляет гиперполяризацию митохондриальной мембраны и снижает образование АФК.

Также необходимо было оценить влияние CCCP на жизнеспособность клеток дрожжей. Тепловое воздействие (45 °С) приводило к значительной гибели клеток дрожжей, которое возрастало с течением времени обработки (рис. 11). Добавление CCCP в низкой концентрации (0,5 мкМ) защищало клетки от гибели при тепловом воздействии (рис. 11). Однако протекторного эффекта не наблюдалось при использовании более высоких концентраций CCCP – 1 и 2 мкМ.

Протонофор ДНФ деполяризует митохондриальную мембрану и ингибирует генерацию АФК в клетках дрожжей

В качестве сравнения была проведена обработка другим классическим протонофором – ДНФ. Как показано на рис. 12 А, агент ДНФ подавлял у клеток индуцируемое тепловым воздействием повышение митохондриального мембранного потенциала. Добавление протонофора ДНФ в среду инкубации клеток подавляло повышение содержания АФК (рис. 12 Б).

Далее необходимо было 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. 13). При более высокой концентрации протекторного эффекта не наблюдалось.

Таким образом, обработка протонофорами эффективно подавляет повышение продукции АФК и увеличение МП при тепловом воздействии, что приводит к повышению устойчивости клеток дрожжей.

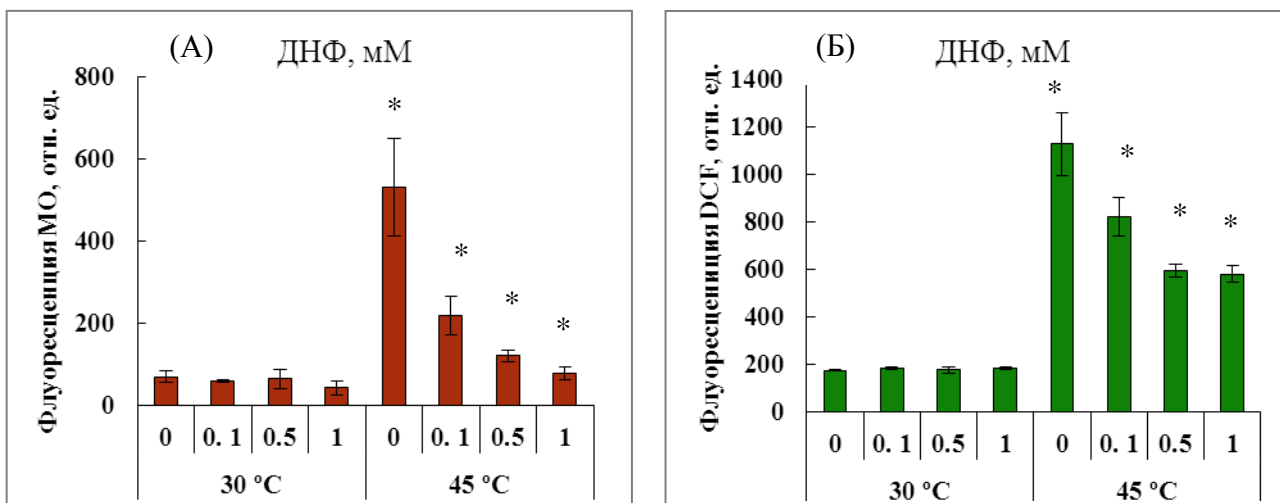


Рис. 12. Эффект ДНФ на изменение МП (А) и продукцию АФК (Б) в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при 45 °С (30 мин).

Количественная оценка интенсивности флуоресценции 50 нМ МО (А) и 50 мкМ DCF (Б). Клетки обрабатывали в течение 30 мин в присутствии ДНФ при 30 и 45 °С. СП – светлое поле. n=3. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

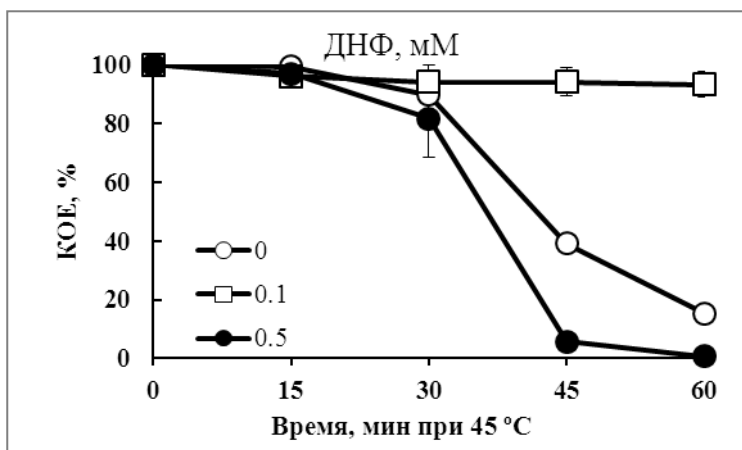


Рис. 13. Эффект ДНФ на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* (W303–1В) при 45 °С. Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. n=3. $M \pm S.E.$

Митохондрии являются основным сайтом продукции АФК в клетках дрожжей при тепловом воздействии

Чтобы доказать, что именно митохондрии являются главной причиной продукции АФК в клетках дрожжей *S. cerevisiae* в работе был использован *petite* мутант.

В клетках дрожжей тепловое воздействие (45 °С, 30 мин) приводило к повышению МП (рис. 14 А, В) и к увеличению содержания АФК (рис. 14 Б, Г). Однако мутация *petite* подавляла и повышение МП, и продукцию АФК при тепловом воздействии. Также было выявлено, что *petite* мутация повышала устойчивость клеток дрожжей при тепловом воздействии (рис. 15).

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

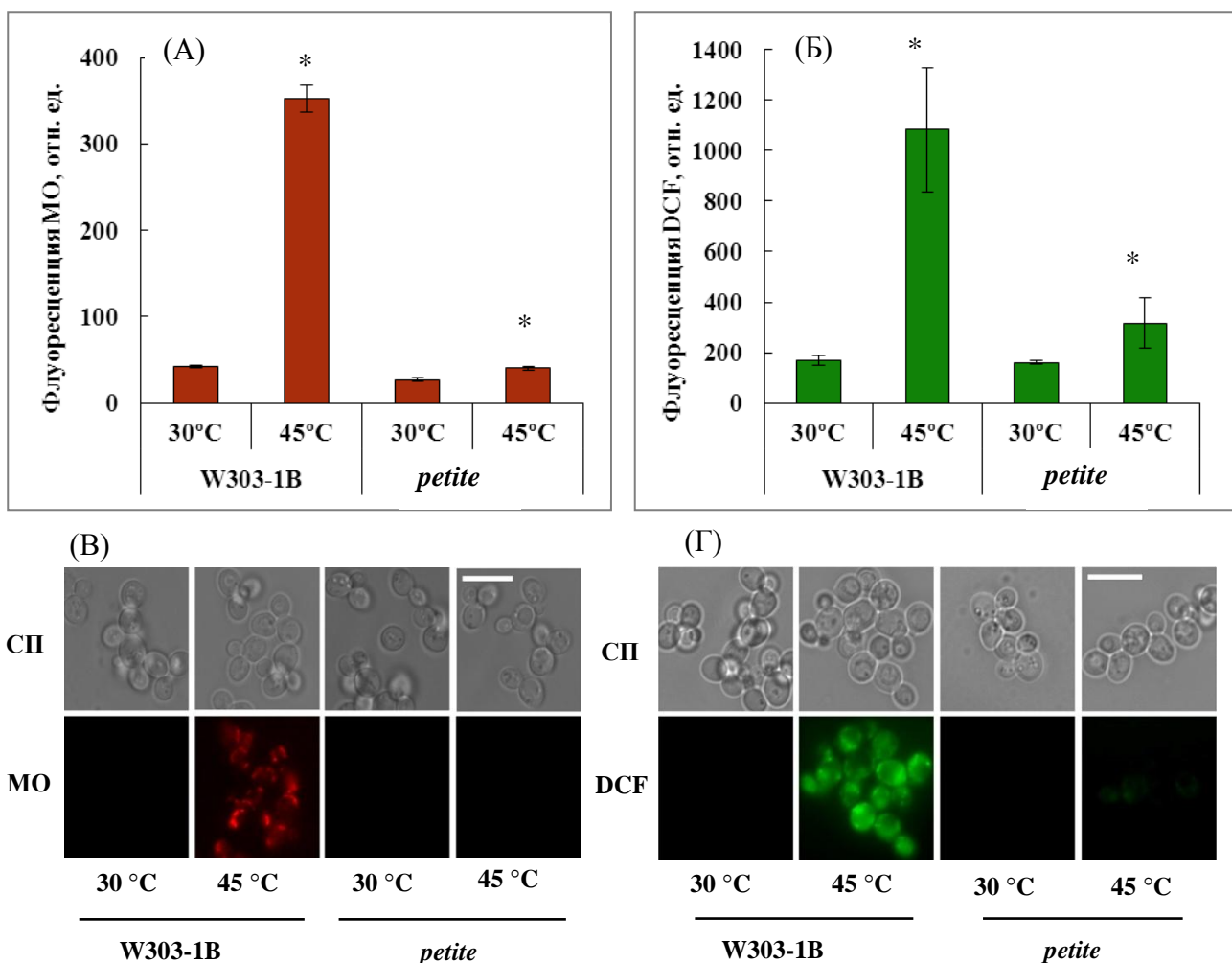


Рис. 14. Эффект мутации *petite* на изменение МП (А, В) и продукцию АФК (Б, Г) в клетках *S. cerevisiae* (W303–1В) при 45 °С (30 мин). Количественная оценка интенсивности флуоресценции 50 нМ МО (А) и 50 мкМ DCF (Б). Клетки обрабатывали при 30 и 45 °С, 30 мин. В, Г – микрофотографии клеток. СП – светлое поле. Масштабный отрезок – 5 мкм. n=3. * – различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

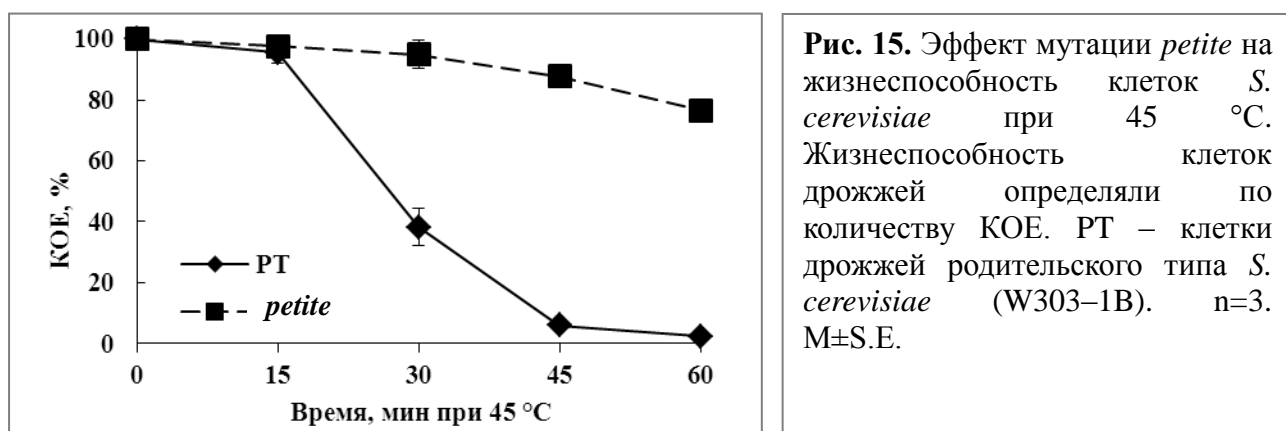


Рис. 15. Эффект мутации *petite* на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* при 45 °С. Жизнеспособность клеток дрожжей определяли по количеству КОЕ. РТ – клетки дрожжей родительского типа *S. cerevisiae* (W303–1В). n=3. М±S.E.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе было установлено, что увеличение содержания АФК в клетках озимой пшеницы (рис. 1 А), сахарного тростника (рис. 3 А) и дрожжей (рис. 10 Б) происходило при тепловом воздействии. Из литературных данных известно, что при повышении температуры у растений, как и у животных (Sreedhar, Srinivas, 2002; Katschinski et al., 2000) усиливается продукция АФК (Колупаев, Карпец, 2009; Miller, Mittler 2006; Königshofer et al., 2008; Locato et al., 2008). Следовательно, повышение продукции АФК при тепловом воздействии – универсальное явление для всех организмов.

Умеренное тепловое воздействие при 45–50 °С приводило к повышению содержания АФК в клетках растений (рис. 1 А, В), а также развитию отсроченной гибели клеток озимой пшеницы и тростника (рис. 2, 4). Явление отсроченной гибели при тепловом воздействии показано другими исследователями. Так, например, в работе (Locato et al., 2008) выявлено, что обработка культуры клеток табака температурой 55 °С (10 мин) приводила к развитию отсроченной гибели, которой предшествовало усиление генерации АФК.

Эксперименты с использованием дрожжей показали, что при умеренном тепловом воздействии усиление генерации АФК играет ключевую роль в гибели дрожжей. Совместная инкубация клеток с протонофорами СССР (рис. 10 Б) и ДНФ (рис. 12 Б), а также мутация *petite* (рис. 14 Б, Г) подавляли генерацию АФК при тепловом воздействии и тем самым защищали клетки дрожжей от гибели. Таким образом, полученные данные указывают, что при умеренном тепловом воздействии от усиления продукции АФК зависит гибель клеток растений и дрожжей.

Одним из основных источников генерации АФК в клетке являются митохондрии. Ряд авторов считают, что при тепловом воздействии происходит снижение потенциала на внутренней мембране митохондрий растений (Zhang et al., 2009; Qi et al., 2011). Напротив, другие исследователи показали, что тепловое воздействие вызывает повышение МП в клетках арабидопсиса (Пятрикас и др., 2014), дрожжей (Федосеева и др., 2012) и млекопитающих (Balogh et al., 2005). В настоящей работе было выявлено, что умеренное тепловое воздействие (45–50 °С) приводило к увеличению потенциала на внутренней мембране митохондрий в клетках растений (рис. 1 Б, Г) и дрожжей (рис. 10 А). Совместная инкубация клеток с протонофором СССР при тепловом воздействии приводила к снижению потенциала на внутренней митохондриальной мембране и понижению продукции АФК (Федяева и др., 2014). Из литературных данных известно, что при действии на клетки других стрессоров происходит повышение МП. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны происходит в клетках млекопитающих при обработке лигандом Fas (Banki et al., 1999), стауроспорином (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). В нашей

работе показано, что холодное воздействие также приводит к повышению МП в культуре клеток озимой пшеницы и сахарного тростника (рис. 9). Однако в культуре клеток сахарного тростника при тепловом воздействии 45 °С, 30 мин, в отличие от 10-минутного действия 45 °С, увеличения МП не происходило, напротив, наблюдалась деполяризация митохондриальной мембраны (рис. 5 Б) и развитие отсроченной гибели клеток (рис. 4).

Известно, что тепловой стресс приводит к кратковременному повышению уровня кальция в цитозоле, что играет важную роль либо в активации экспрессии генов БТШ растений (Saidi et al., 2011), либо в гибели клетки (Li et al., 2012; Gong et al., 1998). В настоящей работе было показано, что при нарушении Ca^{2+} гомеостаза в результате действия хелатора кальция (рис. 7 А) и ингибитора кальциевых каналов (рис. 8 А), происходит снижение потенциала на внутренней мембране митохондрий. Это указывает на то, что повышение МП зависит от уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$.

Также известно, что существует взаимосвязь между продукцией АФК и уровнем $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Гордеева и др., 2003). Это положение подтверждается в данной работе – агенты, предотвращающие поступление Ca^{2+} в цитозоль, снижают содержание АФК при тепловом воздействии в культуре клеток озимой пшеницы (рис. 7 Б и 8 Б). Следовательно, уровень кальция в цитозоле влияет на потенциал на внутренней мембране митохондрий и продукцию митохондриальных АФК.

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. Таким образом, 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 и одновременно снижать продукцию АФК свидетельствует о том, 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.

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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Федяева А.В.** Синтез БТШ и гибель культур клеток растений при тепловом воздействии / **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов // Вестник Иркутского государственного технического университета. – 2014. – № 2. – С. 167–171.

2. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы / **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, И.В. Любушкина, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1202–1210.

3. Механизм гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке. Влияние циклогексимида на этот процесс / Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, **А.В. Федяева** // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 1. – С. 22–32.

4. Мутация *petite* подавляет индукцию синтеза белка теплового шока (Hsp 104) *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе роста / И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, **А.В. Федяева** // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 273–281.

5. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death / I.V. Lyubushkina, O.I. Grabelnych, T.P. Pobezhimova, A.V. Stepanov, **A.V. Fedyaeva**, I.V. Fedoseeva, V.K. Voinikov // Protoplasma. – 2014. – V. 251. – P. 615–623.

6. Активация гибели клеток в суспензионной культуре сахарного тростника под действием повышенных температур / И.В. Любушкина, **А.В. Федяева**, Т.П. Побежимова, А.В. Степанов, Е.Г. Рихванов // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014 – Т. 10, № 4. – С. 13–24.

Статьи в других изданиях и материалах конференций

7. The role of mitochondria during realizing of cell death process, induced by subzero temperature, in suspension cell culture of *Saccharum officinarum* L. / I. Lyubushkina, O. Grabelnych, **A. Fedyaeva**, T. Pobezhimova, A. Stepanov, V. Voinikov // FEBS Congress. The FEBS Journal Supplement. – 2013. – P. 517.

8. The changes of mitochondrial activity in cells of sugar cane suspension culture at the early stage of cell death, caused by the negative temperature influence / I.V. Lyubushkina, **A.V. Fedyayeva**, A.V. Stepanov, O.I. Grabelnych, T.P. Pobezhimova // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. – 2014. – V. 1837. e 73.
9. Development of low-temperatures adaptation mechanisms in winter wheat cells under conditions of a heterotrophic suspension culture / I.V. Lyubushkina, **A.V. Fedyayeva**, A.V. Stepanov, O.I. Grabelnych, K.A. Kirichenko, T.P. Pobezhimova, V.K. Voinikov // *FEBS Journal*. – 2014. – V. 281, Suppl.1. – P. 556. (TUE-382).
10. Воздействие повышенных температур на изменение электрохимического потенциала на внутренней митохондриальной мембране и продукцию активных форм кислорода в клетках суспензионной культуры озимой пшеницы / **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов, В.К. Войников // *Клеточная биология и биотехнология растений: Материалы Международной научно-практической конференции (Минск, 13-15 февраля 2013 г.)*. – 2013. – С. 113.
11. Митохондрии участвуют в реализации процесса гибели клеток в суспензионной культуре сахарного тростника, вызванного действием отрицательной температуры / И.В. Любушкина, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, А.В. Степанов, **А.В. Федяева**, В.К. Войников // *Клеточная биология и биотехнология растений: Материалы Международной научно-практической конференции (Минск, 13-15 февраля 2013 г.)*. – 2013. – С. 101.
12. Повышение электрохимического потенциала и увеличение продукции АФК в клетках суспензионной культуры озимой пшеницы при тепловом воздействии / **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, И.В. Любушкина, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов, В.К. Войников // *Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях: Материалы Всероссийской научной конференции (Иркутск, 10-13 июня, 2013 г.)*. – 2013. – С. 268–271.
13. Дыхательный метаболизм в клетках суспензионной культуры сахарного тростника *Saccharum officinarum* L. на начальной стадии активации программируемой клеточной гибели, вызванной действием отрицательной температуры / И.В. Любушкина, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, В.К. Войников // *Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях: Материалы Всероссийской научной конференции (Иркутск, 10-13 июня, 2013 г.)*. – 2013. – С. 138–142.
14. Динамика активных форм кислорода при действии теплового шока у гетеротрофной культуры клеток *Triticum aestivum* L. и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вклад митохондрий / **А.В. Федяева**, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов, Д.В. Пятрикас, И.В. Федосеева, И.В. Любушкина, В.К. Войников // *Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений: Материалы Первого международного симпозиума (Казань, 17-20 сентября 2013 г.)*. – 2013. – С. 91.
15. Участие активных форм кислорода в активации процесса гибели в суспензионных культурах клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. и сахарного тростника *Saccharum officinarum* L. при действии отрицательной температуры / И.В. Любушкина, О.И. Грабельных, **А.В. Федяева**, Т.П. Побежимова, А.В. Степанов, И.В. Федосеева, В.К. Войников // *Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений: Материалы Первого международного симпозиума (Казань, 17-20 сентября 2013 г.)*. – 2013. – С. 78.
16. Особенности гибели клеток в суспензионных культурах озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. и сахарного тростника *Saccharum officinarum* L., вызванной действием отрицательной температуры / И.В. Любушкина, О.И. Грабельных, **А.В. Федяева**, Т.П. Побежимова, А.В. Степанов, И.В. Федосеева, В.К. Войников // *Биология клеток растений in vitro и биотехнология: тезисы X Международной конференции (Казань, 14-18 октября, 2013 г.)*. – 2013. – С. 177–178.

17. Гибель клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при умеренном тепловом шоке зависит от митохондриального мембранного потенциала / И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, **А.В. Федяева**, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников // Механизмы регуляции функций растительных органелл: Материалы Всероссийской научной конференции (Иркутск, 25-27 июня 2014 г.). – 2014. – С. 91–93.

18. Роль АФК в процессе клеточной гибели в суспензионных культурах озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. и сахарного тростника *Saccharum officinarum* L., вызванной действием повышенных температур / **А.В. Федяева**, И.В. Любушкина, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов // Механизмы регуляции функций растительных органелл: Материалы Всероссийской научной конференции (Иркутск, 25-27 июня 2014 г.). – 2014. – С. 94–96.

19. Relation between mitochondrial membrane potential increase and oxidative stress under heat shock condition in cell cultures of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) / **A.V. Fedyaeva**, A.V. Stepanov, I.V. Lyubushkina, T.P. Pobezhimova, E.G. Rikhvanov, I.V. Fedoseeva, D.V. Pyatrikas, G.B. Borovskii, V.K. Voinikov // Oxidative Stress Conference (3rd October 2014 Parador de Oropesa). – 2014. – P. 65–66.