



УДК 581.1:633/635

## Роль активных форм кислорода и участие митохондрий в развитии программируемой клеточной гибели в coleoptilyах озимой пшеницы

А. В. Корсукова<sup>1,2</sup>, О. И. Грабельных<sup>1,2</sup>, И. В. Любушкина<sup>1,2</sup>, Т. П. Побежимова<sup>1</sup>,  
Н. А. Королева<sup>1</sup>, Н. С. Павловская<sup>1,2</sup>, И. В. Федосеева<sup>1</sup>, В. К. Войников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

<sup>2</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: [avkorsukova@gmail.com](mailto:avkorsukova@gmail.com)

**Аннотация.** Изучены содержание активных форм кислорода (АФК) и некоторые параметры функциональной активности митохондрий из coleoptilyах этиолированных проростков озимой пшеницы в условиях естественного старения и в условиях окислительного стресса, вызванного обработкой 10 мМ перекисью водорода (4 ч). Показано, что старение coleoptilyа (начиная с 6-х суток роста) сопровождается значительным снижением интактности митохондрий и коэффициента дыхательного контроля (ДК), увеличением содержания АФК в митохондриях и частичным высвобождением цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль. Перекись водорода ускоряет гибель клеток coleoptilyах по типу программируемой клеточной гибели с участием митохондрий.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, митохондрии, программируемая клеточная гибель, coleoptilyа, *Triticum aestivum* L.

### Введение

Программируемая клеточная гибель (ПКГ) у растений является важной составляющей процесса развития, механизма защиты от патогенов и реакции на действие различных стрессовых факторов. ПКГ у растений имеет черты сходства с апоптозом у животных (межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина и активация каспазо-подобных молекул), отличия же определяются наличием у растений хлоропластов, вакуоли и клеточной стенки [46]. Важным фактором ПКГ у растений являются активные формы кислорода (АФК) [22]. При этом АФК играют двойственную роль: действуют как сигналы во время фазы индукции ПКГ и как маркеры изменения проницаемости митохондрий, приводящего к гибели клетки. Снижение способности клеток удалять или обезвреживать АФК также может запускать ПКГ [22]. Известно, что перекись водорода – потенциальный индуктор ПКГ у растений. Окислительный стресс, вызываемый обработкой перекисью водорода, служил причиной ПКГ в культуре клеток сои [11], табака [20], арабидопсиса [43]. Также пероксид водорода ускорял апоптоз в клетках coleoptilyах озимой пшеницы [1; 2] и  $CN^{(-)}$ -вызванный апоптоз в замыкающих клетках устьиц из листьев гороха [7].

Coleoptilyа проростков злаков является удобной моделью для изучения процессов ПКГ. Он является ювенильным органом и характеризуется краткостью периода развития с завершением физиологической функции по типу ПКГ. С использованием фрагментации ДНК и изменений на уровне ультраструктурной организации клеток в качестве маркеров апоптоза показано, что в coleoptilyах этиолированных проростков пшеницы апоптоз происходит на 6–8 день [2; 3; 5; 12]. Запрограммированный в онтогенезе растения апоптоз может регулироваться изменением уровня АФК под действием анти- и прооксидантов, что сопровождается тканеспецифичным изменением сроков наступления и интенсивности апоптоза [1].

Роль митохондрий в ПКГ хорошо изучена на животных клетках, при этом показано, что митохондриальный сигнальный путь является эволюционно консервативным у многоклеточных организмов и характеризуется восприятием и усилением сигнала митохондриями, открытием высокопроницаемой митохондриальной поры («permeability transition pore», РТР), набуханием митохондрий и высвобождением из них апоптогенных факторов [16; 23; 44]. В числе последних – цитохром *c*, выход которого в цитозоль рассматривается как пусковой механизм апоптоза у животных [26]. Не вызывает

сомнений, что митохондрии также играют ключевую роль в индукции ПКГ у растений [27; 32; 35; 36]. Однако в отличие от животных выход цитохрома *c* не является обязательной стадией реализации программы гибели у растений [41]. Роль митохондрий при развитии ПКГ в колеоптиле проростков злаков не изучена, однако можно предполагать, что эти органеллы играют важную роль, поскольку показано, что в клетках стареющего колеоптиля этиолированных проростков озимой пшеницы содержатся вакуолярные везикулы, содержащие митохондрии с интактной структурой, активно потребляющие кислород и сохраняющие способность к синтезу собственной ДНК в условиях деградации ядерной ДНК (ядНК) [38].

Целью данной работы явилось изучение содержания АФК и некоторых параметров функциональной активности митохондрий в колеоптилях этиолированных проростков озимой пшеницы в процессе их естественного старения и при окислительном стрессе, вызванном обработкой экзогенной перекисью водорода.

#### **Материалы и методы**

В работе использовали этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская). Семена пшеницы выращивали в течение суток на влажной фильтровальной бумаге при 26 °С в темноте, а затем одинаково проросшие семена отбирали и продолжали выращивать в тех же условиях, отбирая проростки определённого возраста. Возраст проростков исчисляли с момента замачивания семян.

Обработку перекисью водорода проводили на 3-суточных проростках. Для этого проростки погружали корнями в раствор 10 мМ перекиси водорода и выдерживали при температуре выращивания в течение 4 ч. По истечении времени обработки проростки тщательно отмывали от перекиси водорода и оставляли в темноте при температуре 26 °С, отбирая материал сразу, через 3, 5 и 7 суток после воздействия.

Для определения жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков злаков использовали метод восстановления красителя 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) [6]. Исследуемую ткань (0,1 г) инфильтровали в шприце раствором К-На фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,5 % ТТХ, и инкубировали в анаэробных условиях при 26 °С в течение 12 ч в темноте. Затем краситель удаляли 3-кратным промыванием дистиллированной водой. Продукт восстановления ТТХ – форма-зан экстрагировали 96%-ным этанолом в течение 15 мин в термостатируемом шейкере при

60 °С. Концентрацию форма-зан рассчитывали по оптической плотности раствора, которую определяли фотоэлектроколориметрически при длине волны 490 нм. Расчёт проводили в относительных единицах (отн. ед.) на 1 г сырого веса (восстановление ТТХ,  $A_{490}$ /г сырого веса).

Митохондрии выделяли из колеоптилей с помощью дифференциального центрифугирования [4]. Энергетическую активность митохондрий определяли полярографически при 26 °С с платиновым электродом закрытого типа в ячейке объёмом 1,4 мл на полярографе ОН-105 (Radelkis, Венгрия) [8]. Реакционная среда для определения активности митохондрий содержала 18 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,4), 125 мМ  $\text{KCl}$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ ЭДТА. В качестве субстрата окисления использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. Конечная концентрация АДФ в ячейке составляла 200 мкМ. Количество митохондриального белка в суспензии определяли по методу О. Н. Lowry [34]. Из полярограмм рассчитывали скорости фосфорилирующего (состояние 3) и нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания, коэффициент дыхательного контроля по Чансу-Вильямсу (коэффициент ДК) и отношение АДФ:О [17].

Интактность внешней митохондриальной мембраны (%) рассчитывали по скорости аскорбат-зависимого цитохром *c*-стимулируемого  $\text{KCN}$ -чувствительного поглощения кислорода в отсутствии и присутствии 0,04%-ного Тритона X-100.

Общее содержание АФК в колеоптилях и изолированных из них митохондриях определяли с использованием 2',7'-дихлорофлуоресцеин ди-ацетата ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) [39]. Для определения АФК в интактных колеоптилях навеску ткани (0,1 г) инфильтровали в шприце раствором 1 мкМ  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  и инкубировали 30 мин при 26 °С в темноте. Супернатант использовали для измерения флуоресценции. Для определения АФК в митохондриях суспензию митохондрий (0,1–0,2 мг белка) инкубировали в реакционной среде (300 мМ сахароза, 20 мМ MOPS (рН 7,4), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ ЭДТА), содержащей 1 мкМ  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , в течение 25 мин при 26 °С в темноте. Затем образцы центрифугировали при 13 000 г в течение 5 мин и супернатант использовали для определения флуоресценции. Флуоресценцию DCF измеряли на спектрофлуориметре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония). Для возбуждения флуоресценции DCF использовали свет с длиной волны 480 нм, испускание регистрировали на длине волны 524 нм. Содержание АФК рассчитывали в отн. ед./г сырого

го веса (для интактных колеоптилей) или отн. ед./мг белка (для суспензии митохондрий).

Содержание пероксида водорода в колеоптилях определяли с помощью окрашивания 3,3'-диаминобензидином (ДАБ) [28]. Для этого навеску ткани (0,05 г) инфильтровали в шприце раствором ДАБ (0,2 мг/мл) в 10 мМ Трис-ацетатном буфере (рН 5,0) и инкубировали в темноте в течение 5 ч, затем помещали в 70%-ный этанол и инкубировали 20 мин при 80 °С в термостатируемом шейкере. Коричневый осадок, сформировавшийся во время полимеризации ДАБ, экстрагировали из ткани растиранием в ступке с 0,2 М хлорной кислотой. После центрифугирования при 13 000 г в течение 10 мин оптическую плотность супернатанта измеряли спектрофотометрически при 450 нм.

Для выделения общего клеточного белка колеоптиль этиолированных проростков замораживали в жидком азоте и растирали в буфере, содержащем 100 мМ Трис-НСl (рН 7,4–7,6), 3 мМ ДДС-Na, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5–1 мМ фенилметилсульфонилфлюорида в соотношении 1:4. После центрифугирования при 20 000 г в течение 20 мин белок из супернатанта осаждали двукратным объёмом охлажденного до -20 °С ацетона. Супернатант, полученный в процессе выделения митохондрий после первого центрифугирования при 20 000 г в течение 3 мин, был использован для выделения цитоплазматического белка. Цитоплазматический белок осаждали из супернатанта охлажденным до -20 °С ацетоном в соотношении 1:2. Осадок общего клеточного белка, белка цитоплазматической фракции и осадок митохондриальной фракции растворяли в буфере для образца (0,125 М Трис-НСl (рН 6,8), 10 % ДДС-Na, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА, 20 % глицерин, 0,001 % бромфеноловый синий) с последующим нагреванием при 97 °С в течение 5 мин и центрифугированием при 10 000 г в течение 15 мин. Белки наносили на гель, предварительно выровняв концентрации по методу О. Н. Lowry [34], не более 30 мкг на трек. Белки фракционировали электрофоретически в 12,5%-ном полиакриламидном геле с ДДС-Na в модифицированной системе U. K. Laemmli [24], используя камеру Mini-PROTEAN 3 Electrophoretic Cell (BIO-RAD, США). Перенос анализируемых белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) проводили в Towbin-буфере (25 мМ Трис-НСl (рН 9,2), 192 мМ глицин, 10%-ный метанол) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя, используя камеру Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD, США). В работе использовали

антитела против цитохрома *c* (Биосан, Россия). Положительным контролем служил цитохром *c* животного происхождения.

Выделение ДНК проводили по модифицированной нами методике J. Balk and C. J. Leaver [14]. Растительный материал (0,06–0,08 г) растирали в жидком азоте и лизировали на холоде в 0,4 мл буфера, содержащего 100 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ ЭДТА, 500 мМ NaCl и 10 мМ β-меркаптоэтанол, с последующим добавлением 25 мкл 20%-ного ДДС-Na. После инкубации в течение 10 мин при 65 °С к образцам добавляли 200 мкл 5 М ацетата К, перемешивали и инкубировали на льду 20 мин. Белки осаждали центрифугированием при 11 500 г в течение 20 мин. Супернатант (500–600 мкл) вливали в пробирки с охлажденным изопропанолом (600 мкл) и инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре. Нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 11 500 г в течение 15 мин, дважды промывали 70%-ным этанолом, высушивали, перерастворяли в бидистиллированной воде (100 мкл) и затем добавляли 1/10 объёма буфера TE (10 мМ Трис-НСl (рН 7,5) и 1 мМ ЭДТА). Затем инкубировали с РНКазой А (Fermentas, Латвия) 2 ч при 37 °С. Очистку ДНК проводили экстракцией хлороформом с реэкстракцией. К водной фазе добавляли 1/10 объёма ацетата К (рН 4,8), осаждали тремя объёмами 96%-ного этанола. После центрифугирования (15 мин, 11 500 г) полученный осадок высушивали и перерастворяли в буфере TE. Одинаковые количества ДНК разделяли электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л) и фотографировали в УФ-свете с помощью GelDoc (BioRad, США).

Проводили не менее трёх независимых экспериментов. Представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

### Результаты

Изучение жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста (3–10-е сутки роста проростков), выращенных при температуре 26 °С, показало, что с увеличением возраста проростков наблюдается снижение жизнеспособности клеток колеоптиля. Так, по сравнению с 3-ми сутками роста проростков на 6-е сутки увеличение оптической плотности экстрагированного из клеток колеоптилей формазана составило 30 %, на 8-е сутки – 44 %, на 10-е сутки – 53 % (рис. 1).

Определение АФК в клетках колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы

проводили двумя методами: с использованием  $H_2DCF-DA$  (флуориметрический детектор клеточного окислительного стресса, может окисляться перекисью водорода, супероксид анионом, гидроксил анионом, оксидом азота) и ДАБ (окисляется преимущественно перекисью водорода). С использованием обоих красителей показано, что в процессе старения этиолированных проростков пшеницы содержание АФК в клетках колеоптилей возрастает (рис. 2). Так, применение  $H_2DCF-DA$  позволило выявить, что по сравнению с трёхсуточными проростками содержание АФК на 6-е сутки роста проростков возрастало на 85,2 % , на 8-е сутки – на

229 %, на 10-е сутки роста – на 466 % (см. рис. 2, А). При этом содержание перекиси водорода в клетках колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы, оцениваемое по образованию окрашенного продукта полимеризации ДАБ, также увеличивалось с возрастом проростков, однако изменения были не такими значительными, как при использовании  $H_2DCF-DA$ . На 6-е сутки роста проростков наблюдали увеличение содержания перекиси водорода в 2,3 раза, которое практически не изменялось на 8-е сутки, а на 10-е сутки увеличилось в 3 раза по сравнению с третьими сутками (см. рис. 2, Б).

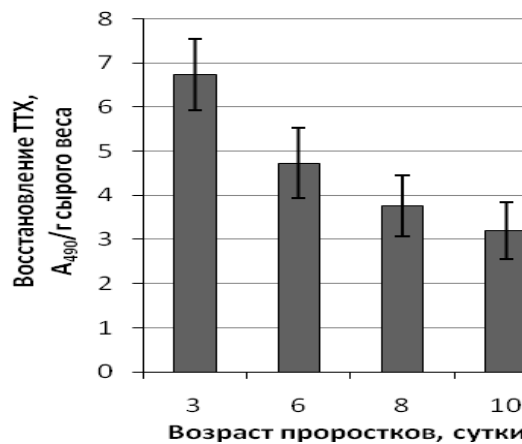


Рис. 1. Изменение жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста,  $n = 18, m \pm S.D.$

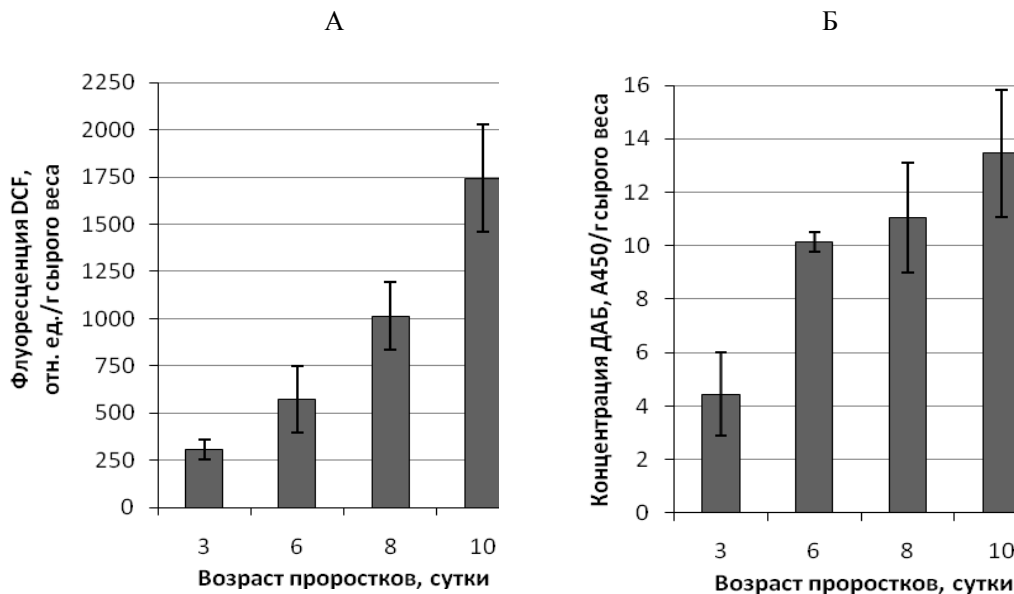


Рис. 2. Содержание АФК и перекиси водорода в клетках колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста: А – содержание АФК,  $n = 7-9, m \pm S.D.$ ; Б – содержание перекиси водорода,  $n = 12, m \pm S.D.$

Из колеоптилей разного возраста были изолированы митохондрии и изучена интактность их внешней мембраны, степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, а также содержание АФК. Как оказалось, митохондрии, изолированные из колеоптилей трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы, имели высокую интактность наружной митохондриальной мембраны и высокую степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, оцениваемую по величине коэффициента ДК (рис. 3, А). Коэффициент ДК у этих митохондрий был равен  $6,33 \pm 1,13$  (на рис. 3, А это значение принято за 100 %). Интактность наружной мембраны митохондрий из колеоптилей трёхсуточных проростков составляла 88–94 % (рис. 3, Б). Как следует из рис. 3, по мере роста проростков и старения колеоптиля происходили изменения функциональной активности изолированных из них митохондрий. На 6-е сутки роста наблюдали значительное снижение интактности митохондрий (на 31 %) и коэффициента ДК (на 63 %). На 8-е и, особенно, на 10-е сутки роста изменения в интактности митохондрий и величине коэффициента ДК становились более выраженными. Так, снижение коэффициента ДК на 10-е сутки роста проростков составило 81 %, снижение интактности – 54 % (см. рис. 3, А). На 6-е сутки роста этиолированных проростков наблюдалось двукратное увеличение содержания АФК в изолированных из колеоптилей митохондриях по сравнению с содержанием АФК в митохондриях из колеоптилей трёхсуточных проростков (см. рис. 3, Б). На 8-е сутки роста содержание АФК в митохондриях практически не изменилось, однако на 10-е сутки увеличение содержания АФК было в 3,4 раза выше, чем у трёхсуточных проростков (см. рис. 3, Б). Нарушение интактности митохондрий в колеоптилях этиолированных проростков озимой пшеницы на 6–10-е сутки роста (см. рис. 3, А) сопровождалось частичным высвобождением цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. На это указывают результаты электрофореза с ДДС-На и последующего иммуноблоттинга с антителами к цитохрому *c* (рис. 3, В). Если в колеоптилях трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы цитохром *c* детектировался только в митохондриальной фракции, то на 6-е, 8-е и 10-е сутки роста проростков его содержание в митохондриальной фракции снижалось, и он обнаруживался в цитоплазматической фракции. Содержание цитохрома *c* в суммарной фракции белков клеток

колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста не изменялось (см. рис. 3, В).

Таким образом, гибель клеток колеоптиля этиолированных проростков озимой пшеницы на 6-е сутки роста при 26 °С сопровождалась повышением содержания АФК как в клетке, так и в митохондриях, снижением степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в изолированных митохондриях, снижением интактности митохондрий и выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму.

Известно, что на 6-е сутки роста в колеоптилях озимой пшеницы происходит межнуклеосомальная фрагментация яДНК, характеризующая тип гибели как ПКГ [2]. Показано, что перекись водорода в концентрации  $10^{-3}$  М индуцирует более быструю гибель клеток колеоптиля – межнуклеосомная фрагментация и деградация яДНК отмечается уже на пятый день роста [1]. Представляло интерес выяснить, какую роль играют митохондрии при развитии гибели клеток колеоптиля под воздействием на этиолированные проростки перекиси водорода в концентрации, индуцирующей процесс клеточной гибели.

Была выбрана концентрация перекиси водорода 10 мМ, которая запускала процесс клеточной гибели уже через 4 ч воздействия.

В ходе экспериментов было изучено влияние обработки перекисью водорода на ингибирование роста этиолированных проростков озимой пшеницы, жизнеспособность клеток колеоптилей, сопряжение процессов окисления и фосфорилирования митохондрий и выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. Выявлено, что воздействие перекиси водорода вызывает ингибирование длины побегов проростков озимой пшеницы на 54 %.

Жизнеспособность клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы, обработанных перекисью водорода, по мере роста проростков снижалась сильнее, чем у контрольных, не подвергнутых обработке. Увеличение оптической плотности экстрагированного из клеток колеоптилей формазана сразу после обработки было на 37 % выше, чем в колеоптилях необработанных проростков (рис. 4). Через трое суток после воздействия выживаемость клеток колеоптилей проростков, обработанных перекисью водорода, была на 44 % меньше выживаемости клеток колеоптилей, не подвергнутых окислительному стрессу.

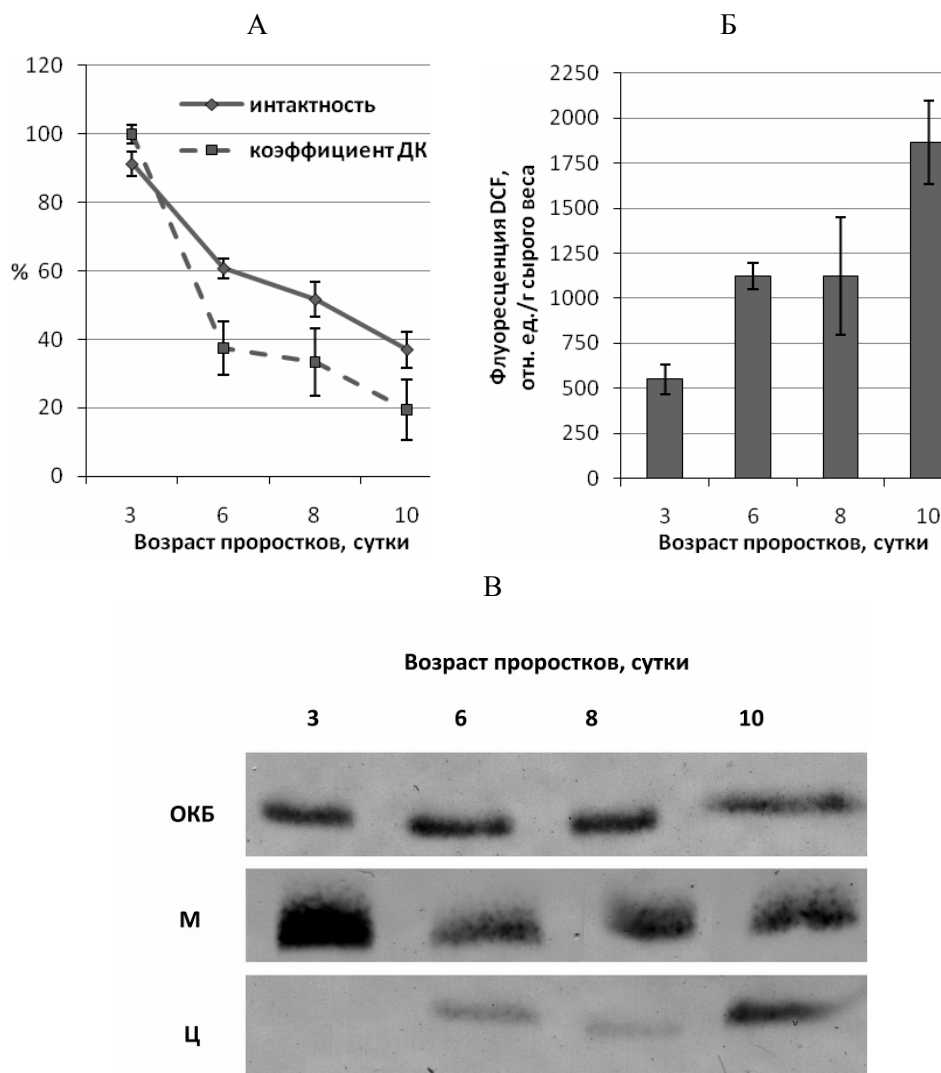


Рис. 3. Изменение функциональной активности митохондрий, изолированных из клеток coleoptилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста: А – изменение интактности внешней мембраны митохондрий и коэффициента ДК. Коэффициент ДК митохондрий из coleoptилей трёхсуточных проростков  $6,33 \pm 1,13$  принят за 100%.  $n = 3-7$ ,  $m \pm S.D.$ ; Б – содержание АФК в митохондриях.  $n = 8-10$ ,  $m \pm S.D.$ ; В – вестерн-блоттинг общего, митохондриального и цитоплазматического белков из клеток coleoptилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста с антителами против цитохрома *c*.

Обозначения: ОКБ – общий клеточный белок; М – митохондриальный белок; Ц – цитоплазматический белок

Окислительный стресс, вызванный обработкой перекисью водорода, приводил к снижению коэффициента ДК в митохондриях трёхсуточных проростков непосредственно после воздействия на 47% (рис. 5, А). Через сутки после воздействия коэффициент ДК снизился незначительно, а на 5-е сутки снизился на 48% (на 29% ниже, чем у контрольных проростков), а на 6-е сутки роста – на 64% (на 48% ниже, чем у контрольных проростков) (см. рис. 5, А).

Снижение коэффициента ДК в митохондриях из coleoptилей, подвергнутых окисли-

тельному стрессу, сопровождалось частичным высвобождением цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму сразу же после обработки проростков перекисью водорода (рис. 5, Б). Если в митохондриях клеток coleoptилей трёхсуточных проростков до обработки перекисью водорода цитохром *c* детектировался только в митохондриальной фракции, то после обработки его содержание в митохондриальной фракции снижалось, и он обнаруживался в цитоплазматической фракции (см. рис. 5, Б).

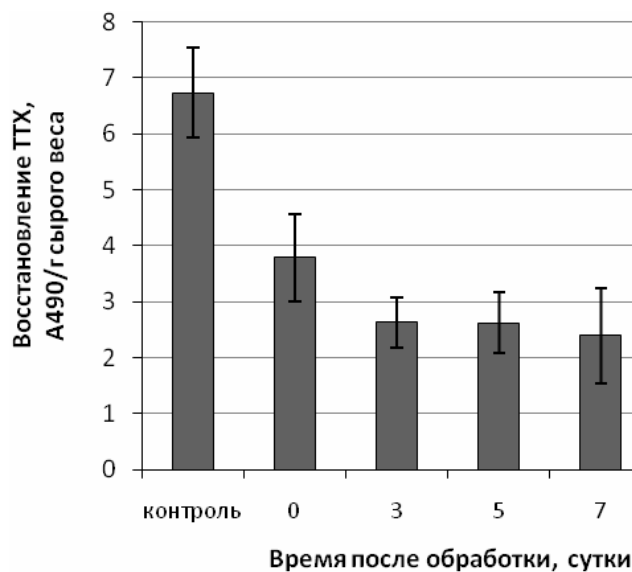


Рис. 4. Влияние обработки перекисью водорода (10 мМ  $H_2O_2$ , 4 ч) на изменение жизнеспособности клеток coleoptилей трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы сразу и через 3, 5 и 7 суток отрастания при 26 °С,  $n = 18$ ,  $m \pm S.D.$

Обозначения: контроль – жизнеспособность клеток coleoptилей трёхсуточных этиолированных проростков до обработки перекисью водорода

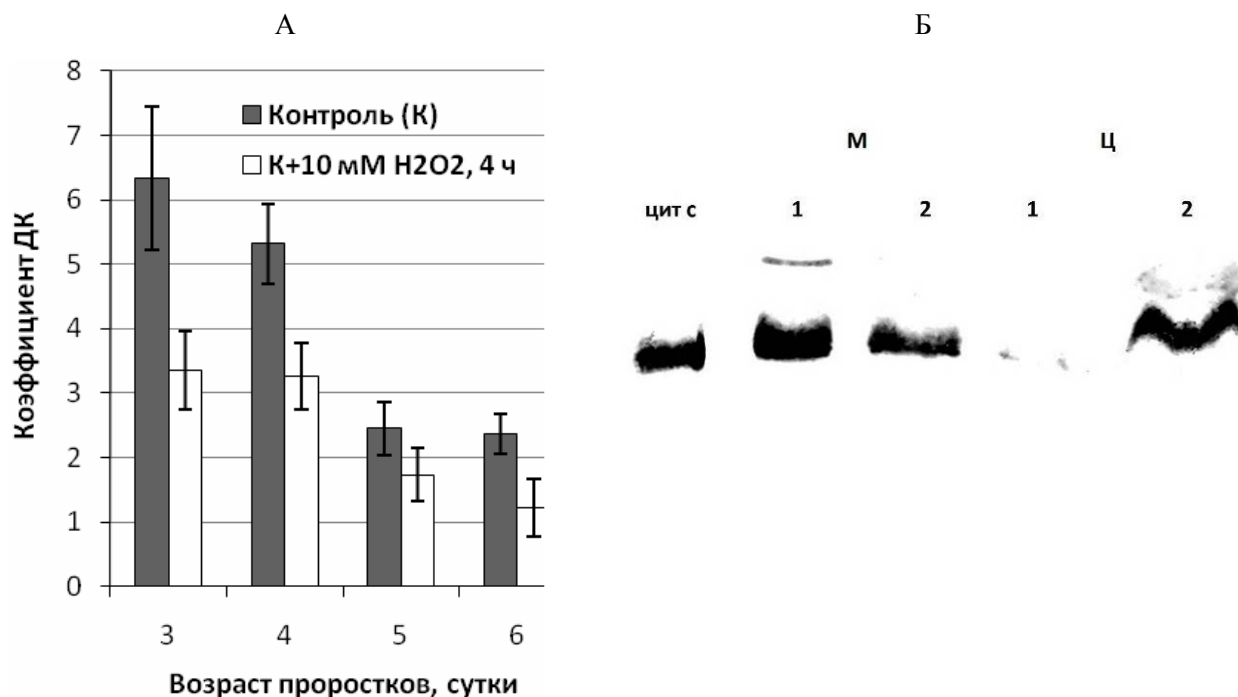


Рис. 5. Изменение функциональной активности митохондрий, изолированных из клеток coleoptилей контрольных и подвергнутых окислительному стрессу этиолированных проростков озимой пшеницы. А – изменение коэффициента ДФК.  $n = 3-4$ ,  $m \pm S.D.$ ; Б – вестерн-блоттинг митохондриальных и цитоплазматических белков из coleoptилей этиолированных проростков озимой пшеницы с антителами против цитохрома *c* в условиях окислительного стресса, индуцированного обработкой перекисью водорода (10 мМ  $H_2O_2$ , 4 ч).

Обозначения: цит *c* – животный цитохром *c*; М – митохондриальный белок; Ц – цитоплазматический белок; 1 – К (coleoptили трёхсуточных проростков); 2 – К + 10 мМ  $H_2O_2$ , 4 ч (coleoptили трёхсуточных проростков после обработки 10 мМ перекисью водорода в течение 4 ч)

Таким образом, окислительный стресс, вызванный обработкой проростков перекисью водорода, приводил к более значительному снижению коэффициента ДК в изолированных из колеоптилей митохондриях по сравнению с митохондриями контрольных проростков и выходу цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. Нами также была изучена фрагментация (деградация) ДНК, выделенной из колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста (3–6 суток) до и после обработки 10 мМ перекисью водорода. Как видно

из рис. 6, в препарате из колеоптилей трёхсуточных проростков присутствовала высокомолекулярная ДНК, а по мере старения проростков происходила её постепенная деградация. Обработка трёхсуточных проростков перекисью водорода в течение 4 ч сопровождалась деградацией ДНК колеоптилей сразу после воздействия, а через 2-е и 3-е суток отрастания проростков на воде при 26 °С происходила полная деградация высокомолекулярной ДНК в колеоптилях (см. рис. 6).

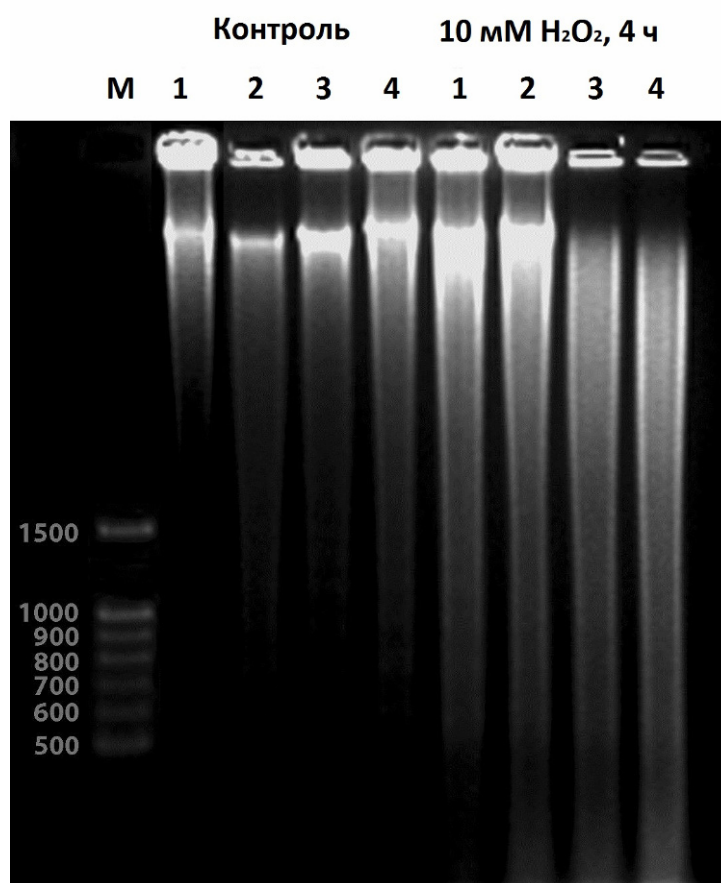


Рис. 6. Электрофореграмма в 1,5%-ном агарозном геле ДНК из контрольных и подвергнутых обработке перекисью водорода (10 мМ  $H_2O_2$ , 4 ч) клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы.

Обозначения: М – маркеры молекулярного веса ДНК, п. н.; 1 – колеоптиль трёхсуточных проростков; 2 – колеоптиль четырёхсуточных проростков; 3 – колеоптиль пятисуточных проростков; 4 – колеоптиль шестисуточных проростков

### Обсуждение

Увеличение содержания АФК в клетке считается одним из первых сигналов, активирующих ПКГ как у растений, так и у животных [19; 21; 33; 37; 43]. В гетеротрофных культурах и нефотосинтезирующих частях растений основным источником АФК являются митохондрии [29].

Как следует из полученных нами данных, снижение жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы (см. рис. 1) сопровождается увеличением содержания АФК в клетке (см. рис. 2), при этом содержание АФК в митохондриях также растёт (см. рис. 3, Б). Обработка проростков озимой пшеницы перекисью водорода индуцировала быстрое снижение жизнеспособности



клеток колеоптиля (см. рис. 4), по-видимому, связанное с более значительной генерацией АФК в этих условиях.

Окислительный стресс может вызывать нарушения в структуре митохондриальных мембран и функциях митохондриальных белков. Изменения не только уровня АФК, но и электрохимического потенциала на внутренней митохондриальной мембране могут являться одними из первых сигналов возможной ПКГ [35]. Увеличенная концентрация ионов кальция в цитозоле и окислительный стресс вносят вклад в открытие РТР, которая деполяризует митохондрии и приводит к набуханию и последующему высвобождению цитохрома *c* из межмембранного пространства [40]. В нормальных условиях цитохром *c* функционирует как часть дыхательной цепи, однако выход цитохрома *c* из митохондрий в результате открытия РТР может быть пусковым механизмом апоптоза. У животных выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль запускает реализацию внутреннего пути ПКГ, который приводит к активации инициаторной каспазы-9, а через неё всего каспазного каскада [18; 25; 42].

У растений при развитии ПКГ наблюдается активация «каспазо-подобных» протеаз – фитаспаз (растительная аспартат-специфичная протеаза) [10; 31]. Показано участие фитаспаз в осуществлении ПКГ, вызванной абиотическими стрессами, такими, как окислительный и солевой [31]. При этом развитие ПКГ с участием фитаспаз сопровождалось выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль и накоплением АФК [31]. Выход цитохрома *c* при развитии ПКГ у растений показан в многочисленных работах. Так, установлено, что окислительный стресс, вызванный обработкой перекиси водорода, является причиной выхода цитохрома *c* в цитозоль в клетках арабидопсиса [43] и табака [20]. ПКГ, индуцированная аноксией у озимой пшеницы [45] и тепловым шоком в растениях огурца [14] и суспензионной культуре арабидопсиса [30], также приводила к высвобождению цитохрома *c* из митохондрий. Частичному высвобождению цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, которое происходило у мутантов по цитоплазматической мужской стерильности подсолнуха, предшествовало снижение интактности внешней митохондриальной мембраны и падение коэффициента ДК [15]. Из представленных этими авторами данных следует, что снижение интактности внешней митохондриальной мембраны, падение коэффициента ДК и выход цитохрома *c* из митохонд-

рий являются событиями, сопровождающими развитие ПКГ у растений.

В нашей работе снижение жизнеспособности клеток колеоптилей с увеличением возраста проростков озимой пшеницы сопровождалось изменением функциональной активности изолированных из них митохондрий. Помимо увеличения содержания АФК в митохондриях (см. рис. 3, Б), наблюдалось снижение степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, снижение интактности митохондрий (см. рис. 3, А) и выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму (см. рис. 3, В). Наблюдавшийся частичный выход цитохрома *c* говорит о том, что часть митохондрий при развитии ПКГ в колеоптилях озимой пшеницы оставалась неповреждённой. Как показано Б. Ф. Ванюшиным и соавторами [12], отличительными ультраструктурными признаками апоптоза на ранней стадии развития колеоптиля и начального листа пяти-шестидневных проростков являются: вакуолизация цитоплазмы; специфическая фрагментация цитоплазмы и появление в вакуоли уникальных одномембранных везикул, содержащих активные органеллы; прекращение синтеза ядерной ДНК; конденсация и маргинация хроматина в ядре; межнуклеосомная фрагментация яДНК и интенсивный синтез митохондриальной ДНК в вакуолярных везикулах. На наш взгляд, наличие вакуолярных везикул, содержащих митохондрии с интактной структурой, активно потребляющие кислород и сохраняющие способность к синтезу собственной ДНК в условиях деградации яДНК, как раз объясняет частичный выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль в процессе реализации ПКГ в колеоптилях этиолированных проростков озимой пшеницы.

Окислительный стресс, вызванный обработкой проростков озимой пшеницы 10 мМ перекисью водорода в течение 4 ч, индуцировал более быстрое снижение жизнеспособности клеток колеоптилей (см. рис. 4). Снижение жизнеспособности сопровождалось деградацией тотальной ДНК сразу после обработки перекисью водорода, а через 2–3-е суток происходила полная деградация высокомолекулярной ДНК (см. рис. 6). Об участии митохондрий в реализации гибели клеток колеоптиля в индуцируемых перекисью водорода условиях свидетельствуют значительное снижение степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования митохондрий и выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму (см. рис. 5).

Ранее нами было показано существование у трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы циклоспорин А-чувствительной митохондриальной поры [9]. Возможно, высвобождение цитохрома *c* из митохондрий в процессе реализации ПКГ в колеоптилях этиолированных проростков как в процессе естественного старения, так при окислительном стрессе, вызванном обработкой проростков перекисью водорода, происходило в результате открытия этой поры.

### Заключение

Наблюдения за развитием гибели в клетках колеоптилей озимой пшеницы в естественных и индуцированных окислительным стрессом условиях показали, что отмирание клеток колеоптиля происходит по типу ПКГ, по мере их гибели наблюдается усиленное образование АФК как в самих клетках колеоптиля, так и в изолированных из них митохондриях. Экзогенная перекись водорода (10 мМ) ингибирует ростовые процессы у контрольных этиолированных проростков и ускоряет процесс естественной гибели клеток колеоптиля.

Таким образом, накопление АФК является причиной старения клеток колеоптиля в этиолированных проростках озимой пшеницы, а митохондрии как органеллы, от функционирования которых зависит обеспеченность клеток энергией, играют ключевую роль в реализации программы клеточной гибели колеоптиля.

Представляется перспективным дальнейшее изучение влияния закалывания низкими положительными температурами на протекание естественных процессов старения клеток колеоптиля, а также функционирования митохондрий в клетках, закалённых к холоду проростков озимой пшеницы.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (проект ФЦП № 2012-1.1-12-000-2008-023).*

### Литература

1. Апоптоз в первом листе у этиолированных проростков пшеницы: влияние антиоксиданта ионола (ВНТ) и перекисей / В. А. Замятнина [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – С. 253–264.
2. Ванюшин Б. Ф. Апоптоз у растений / Б. Ф. Ванюшин // Успехи биол. химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
3. Действие антиоксиданта ионола (ВНТ) на рост и развитие этиолированных проростков пшеницы: контроль за апоптозом, делением клеток, ультраструктурой органелл и дифференцировкой

пластид / Л. Е. Бакеева [и др.] // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – С. 1048–1059.

4. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы / Т. П. Побежимова [и др.] // Физиол. растений. – 2001. – Т. 48. – С. 238–244.

5. Межнуклеосомная фрагментация и синтез ДНК в проростках пшеницы / М. Д. Киринос [и др.] // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 48–57.

6. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А. Г. Еникеев [и др.] // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 423–426.

7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> усиливает CN<sup>-</sup>-индуцированный апоптоз в листьях гороха / В. Д. Самуилов [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 481–492.

8. Трушанов А. А. Изготовление в лабораторных условиях закрытого полярографического электрода Кларка // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / отв. ред. Г. М. Франк. – М.: Наука, 1973. – 221 с.

9. Циклоспорин А-чувствительная митохондриальная пора озимой пшеницы при низкотемпературном и окислительном стрессах / Н. С. Павловская [и др.] // Докл. АН. – 2007. – Т. 417, № 2. – С. 283–285.

10. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases / A. B. Vartapetian [et al.] // Cell Death Differ. – 2011. – Vol. 18. – P. 1289–1297.

11. Amor Y. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death: possible involvement of peroxidase and of alternative oxidase / Y. Amor, M. Chevion, A. Levine // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 477 – P. 175–180.

12. Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents / B. F. Vanyushin [et al.] // Int. Rev. Cytol. – 2004. – Vol. 233. – P. 135–179.

13. Baker C. J. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disk assay using Evans blue / C. J. Baker, N. M. Mock // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1994. – Vol. 39. – P. 7–12.

14. Balk J. Translocation of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants / J. Balk, C. J. Leaver, P. F. McCabe // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 463. – P. 151–154.

15. Balk J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release / J. Balk, C. J. Leaver // The plant cell. – 2001. – Vol. 13. – P. 1803–1818.

16. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death / M. Crompton // Biochem. J. – 1999. – Vol. 341. – P. 233–249.

17. Estabrook R. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratio / R. Estabrook // Methods Enzymol. – 1967. – Vol. 10. – P. 41–47.

18. Guimarães C. A. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles / C. A. Gui-

- marães, R. Linden // Eur. J. Biochem. – 2004. – Vol. 271. – P. 1638–1650.
19. Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism / M. Wu [et al.] // J. Exp. Bot. – 2011. – Vol. 62. – P. 235–248.
20. Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner / V. Houot [et al.] // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52. – P. 1721–1730.
21. Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP Kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis* / P. Wang [et al.] // Plant Cell. – 2010. – Vol. 22. – P. 2981–2998.
22. Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of PCD in plants and animals / T. Jabs // Biochem. Pharmacol. – 1998. – Vol. 57. – P. 231–245.
23. Kroemer G. Mitochondrial control of cell death / G. Kroemer, J. C. Reed // Nat. Med. – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.
24. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
25. Liu H. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis / H. Liu, R. Baliga // J. Am. Soc. Nephrol. – 2005. – Vol. 16. – P. 1985–1992.
26. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria / C. Garrido [et al.] // Cell Death Differ. – 2006. – Vol. 13. – P. 1423–1433.
27. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death / X-H. Yu [et al.] // Cell Death Differ. – 2002. – Vol. 9. – P. 189–198.
28. Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species contents in *Arabidopsis* cell culture but not in whole plants / V. I. Tarasenko [et al.] // Biol. Plantarum. – 2012. – Vol. 56. – P. 635–640.
29. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
30. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture / E. G. Rikhvanov [et al.] // Plant J. – 2007. – Vol. 52, N 4. – P. 763–768.
31. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity / N. V. Chichkova [et al.] // EMBO J. – 2010. – Vol. 29. – P. 1149–1161.
32. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death / A. Vianello [et al.] // Physiol. Plant. – 2007. – Vol. 129. – P. 242–252.
33. 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. – Vol. 134. – P. 1100–1112.
34. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
35. Reape T. J. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants / T. J. Reape, P. F. McCabe // Apoptosis. – 2010. – Vol. 15. – P. 249–256.
36. Scott I. Mitochondria and cell death pathways in plants: actions speak louder than words / I. Scott, D. C. Logan // Plant Signaling & Behavior. – 2008. – Vol. 3. – P. 475–477.
37. Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet C overexposure / C. Gao [et al.] // Plant Signaling & Behavior. – 2008. – Vol. 3. – P. 197–198.
38. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles / L. E. Bakeeva [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 457. – P. 122–125.
39. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells / D. P. Maxwell [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 8271–8276.
40. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant / J. C. Goldstein [et al.] // Nature Cell Biol. – 2000. – Vol. 2. – P. 156–162.
41. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. / N. Yao [et al.] // Plant J. – 2004. – Vol. 40. – P. 596–610.
42. Thornberry N. A. Caspases / N. A. Thornberry, Y. Lazebnik // Enemies Within Science. – 1998. – Vol. 281, N 5381. – P. 1312–1316.
43. Tiwari B. S. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death / B. S. Tiwari, B. Belenghi, A. Levine // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 128. – P. 1271–1281.
44. Tsujimoto Y. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death / Y. Tsujimoto, S. Shimizu // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12. – P. 835–840.
45. Virolainen E. Ca<sup>2+</sup>-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from Wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress / E. Virolainen, O. Blokhina, K. Fagerstedt // Ann. Bot. – 2002. – Vol. 90. – P. 509–516.
46. Williams B. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it / B. Williams, M. Dickman // Mol. Plant Path. – 2008. – Vol. 9. – P. 531–544.

## Roles of reactive oxygen species and a participation of mitochondria in winter wheat coleoptiles during a programmed cell death realization

A. V. Korsukova<sup>1,2</sup>, O. I. Grabelnykh<sup>1,2</sup>, I. V. Lyubushkina<sup>1,2</sup>, T. P. Pobezhimova<sup>1</sup>, N. A. Koroleva<sup>1</sup>, N. S. Pavlovskaya<sup>1,2</sup>, I. V. Fedoseeva<sup>1</sup>, V. K. Voinikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

<sup>2</sup>*Irkutsk State University, Irkutsk*

**Abstract:** A content of reactive oxygen species (ROS) and some parameters of mitochondria functional activity from coleoptiles of winter wheat etiolated acrospires during natural aging and under oxygen stress conditions, induced with treatment of 10 mM hydrogen peroxide (for 4 h), have been studied. It has been shown that the coleoptile aging (as from the 6-th day of growth) is accompanied by a significant decrease of mitochondria intact and the coefficient of a respiration control (RC), an increase of the ROS content in mitochondria and a partial release of the cytochrome *c* from mitochondria to cytosol. Hydrogen peroxide hastens a cell death in the coleoptiles according to the type of the programmed cell death with mitochondria participation.

**Key words:** reactive oxygen species, mitochondria, programmed cell death, coleoptile, *Triticum aestivum* L.

*Корсукова Анна Викторовна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
аспирант  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: avkorsukova@gmail.com*

*Korsukova Anna Victorovna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
doctoral student  
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: avkorsukova@gmail.com*

*Грабельных Ольга Ивановна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: grolga@sifibr.irk.ru*

*Grabelnykh Ol'ga Ivanovna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
Ph. D. of Biology, senior research scientist  
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: grolga@sifibr.irk.ru*

*Любушкина Ирина Викторовна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
кандидат биологических наук,  
младший научный сотрудник  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: estel\_86@mail.ru*

*Lyubushkina Irina Victorovna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
Ph. D. of Biology, junior research scientist  
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: estel\_86@mail.ru*

*Побезжимова Тамара Павловна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru*

*Pobezhimova Tamara Pavlovna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
D. Sc. in Biology, principal research scientist  
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru*

*Королева Нина Анатольевна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
ведущий инженер  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: malus-55@mail.ru*

*Koroleva Nina Anatolyevna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
leading engineer  
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: malus-55@mail.ru*

*Павловская Наталья Сергеевна*  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: pavnatser@mail.ru

*Федосеева Ирина Владимировна*  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

*Войников Виктор Кириллович*  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
доктор биологических наук,  
директор института  
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54,  
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru

*Pavlovskaya Natalya Sergeevna*  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
Ph. D. of Biology, research scientist

phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: pavnatser@mail.ru

*Fedoseeva Irina Vladimirovna*  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
Ph. D. of Biology, research scientist

phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

*Voinikov Victor Kirillovich*  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033  
D. Sc. in Biology, Director

phone: (3952) 42-67-21, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru