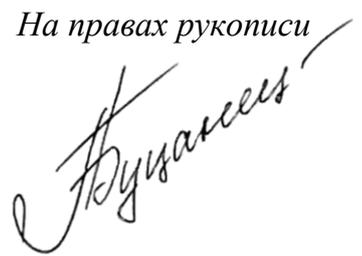


На правах рукописи


Буцанец Павел Андреевич

**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ
АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2018

Работа выполнена в лаборатории Дыхания растений и механизмов его регуляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель: **ШУГАЕВ Александр Григорьевич**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **ГРАБЕЛЬНЫХ Ольга Ивановна**
доктор биологических наук, доцент,
гл. научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук Иркутский научный центр (СИФИБР СО РАН)

ЛЮБИМОВ Валерий Юрьевич
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита состоится « 19 » _____ марта 2019 года в 13-00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., д. 35. Тел.: (499) 678-54-00. Факс: (499) 678-54-20. E-mail: ifr@ippras.ru, m-azarkovich@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук: www.ippras.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Салициловая кислота (СК) – фитогормон фенольной природы, оказывающий совместно с другими фитогормонами регуляторное действие на многие физиологические процессы: прорастание семян, цветение термогенных растений, старение листьев, дыхание, фотосинтез (Raskin et al., 1989, 1992a; 1992b; Rivas-San Vicente, Plasencia, 2011). СК, являясь также сигнальной молекулой, играет ключевую роль в формировании защитных реакций растений на действие различных биотических и абиотических стресс-факторов (Horvath et al., 2007; Vlot et al., 2009; Dempsey, Klessig, 2017). Известной особенностью данного фитогормона является изменение ее внутриклеточного уровня в очень широком диапазоне под влиянием различных внешних и внутренних факторов. Например, в зараженных патогеном клетках уровень СК и ее производных может возрасти в 10-100 раз (Malamy et al., 1992; Enyedi et al., 1992), достигая концентрации 70 мкМ (Norman et al., 2004). Еще более существенное накопление СК обнаружено в некоторых трансгенных растениях (Verberne et al., 2000). Кроме того, показано, что клетки растений способны активно поглощать экзогенную СК, накапливая ее до очень высокой (миллимолярной) концентрации (Norman et al., 2004). Это позволило предположить, что влияние СК на клеточный метаболизм может осуществляться различными путями. При этом, гормон-рецепторный путь передачи сигнала СК, функционирующий при низких уровнях фитогормона в клетках, играет, по-видимому, важнейшую роль в формировании устойчивости за счет активации экспрессии большинства генов, кодирующих защитные белки растений (PR-белки; Janda, Ruelland, 2015; Dempsey, Klessig, 2017). Вместе с тем, не исключено, что при повышении уровня СК она может осуществлять свою защитную функцию иным путем, изменяя редокс-гомеостаз клетки, в частности, контролируя активность ключевых про- и антиоксидантных ферментов (Kawano et al., 2004; Janda, Ruelland, 2015), а также функционирование митохондрий, включая процесс образования в них активных форм кислорода (АФК; Belt et al., 2017). При этом в литературе накапливаются данные свидетельствующие о том, что митохондрии, а именно образующиеся в них АФК, могут быть вовлечены в передачу сигнала СК и других фитогормонов при формировании ответной адаптивной реакции растений на действие неблагоприятных факторов среды (Chivasa et al., 1997; Maxwell et al., 2002; Gilliland et al., 2003; Gleason et al., 2011; Berkowitz et al., 2016). В последнее время, с использованием трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* L. было показано, что важную роль в процессе формирования устойчивости растений играют митохондрии, являющиеся одной из мишеней регуляторного действия СК (Jardim-Messeder et al., 2015; Nie et al., 2015; Belt et al., 2017). В этом процессе могут быть задействованы АФК-генерирующие переносчики электронов дыхательной цепи (комплексы II и III), на активность которых СК оказывает прямое действие (Gleason et al., 2011; Nie et al., 2015; Belt et al., 2017), а также альтернативная CN-резистентная оксидаза (АО), которая регулируется СК через экспрессию генов и препятствует перевосстановленности переносчиков электронов в цепи и избыточному образованию АФК при стрессе (Maxwell et al., 2002; Грабельных и др., 2011, 2014).

Рассматривается также возможное участие митохондрий, СК и АФК в реакции сверхчувствительности, в ходе которой происходит открытие во внутренней мембране митохондрий поры неспецифической проницаемости – РТР (от permeability transition pore), что сопровождается диссипацией мембранного потенциала ($\Delta\Psi$), набуханием органелл и выходом из них цитохрома *c* и других проапоптотических белков. Это приводит к локальной апоптозо-подобной гибели клеток в месте проникновения паразита (Reape, McCabe, 2008; Mur et al., 2008; Van Aken, Van Breusegem, 2015). Способность СК индуцировать открытие РТР была показана только на митохондриях животных (Battaglia et al., 2005). Крайне мало известно о влиянии СК и других фитогормонов на метаболическую активность митохондрий растений. В наиболее обстоятельной работе Norman et al. (2004) было показано, что низкие концентрации СК (меньше 1.0 мМ) разобщают, а более высокие ингибируют дыхание митохондрий. Однако количество работ посвященных этому вопросу остается весьма ограниченным, а представленные в них результаты достаточно противоречивы (Xie, Chen, 1999; De Souza et al., 2011; Nie et al., 2015; Belt et al., 2017).

Цель и задачи исследования. Цель исследования заключалась в изучении влияния СК в широком диапазоне концентраций на метаболическую активность и проницаемость мембран митохондрий семядолей люпина желтого (*Lupinus luteus* L., сорт Дружный-165) и узколистного (*Lupinus angustifolius* L., сорт Дикаф-14), корнеплодов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L., сорт Верхняячская-31), а также на экспрессию генов АО и активность альтернативного пути дыхания (АП) митохондрий *L. luteus*. Для достижения этой цели поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать гены белка АО *L. luteus* и изучить влияние СК в различных концентрациях на их экспрессию;
2. Изучить влияние СК на активность цитохромного и альтернативного путей дыхания в ткани семядолей *L. luteus* и в выделенных из них митохондриях;
3. Получить суспензию митохондрий из исследуемых объектов, отвечающих известным критериям интактности и изучить влияние СК (в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-3} М) на их метаболическую активность;
4. Исследовать влияние СК в различных концентрациях на проницаемость внутренней мембраны и индукцию РТР в митохондриях *L. angustifolius* и *B. vulgaris*;
5. Изучить влияние СК на генерацию перекиси водорода в митохондриях *L. angustifolius*.

Положения выносимые на защиту.

1. В семядолях проростков *L. luteus* альтернативная CN-резистентная оксидаза митохондрий кодируется как минимум тремя генами (*AOX1a*, *AOX1b* и *AOX2*). В зависимости от концентрации, экзогенная СК дифференцированно активирует экспрессию двух из них (*AOX1a* и *AOX2*). СК-индуцированная экспрессия генов АО сопровождается достоверной активацией альтернативного пути дыхания в интактных семядолях и в выделенных из них митохондриях.

2. СК способна оказывать регуляторное воздействие практически на все основные параметры функционирования митохондрий (скорость окисления субстратов в цикле Кребса, эффективность процесса окислительного фосфорилирования, генерацию мембранного потенциала и образование перекиси водорода), а также индуцировать пермеабиллизацию внутренней мембраны. При этом характер действия СК зависит от ее концентрации, длительности инкубации митохондрий в ее присутствии, и функционального состояния органелл.

Научная новизна. Впервые показано, что обработка СК семядолей этиолированных проростков *L. luteus* приводит к индукции гена *АОХ2*. Впервые показано, что эффект СК на метаболическую активность митохондрий зависит не только от действующей концентрации, но также от длительности воздействия на интактные органеллы и, по-видимому, от разной чувствительности к фитогормону митохондрий, изолированных из растений с различным физиологическим статусом. Впервые показано, что СК индуцирует протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий *L. angustifolius*, вероятно, вследствие открытия МРК, вызванного окислительным стрессом. Показано, что СК активирует образование перекиси водорода в митохондриях *L. angustifolius*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения диссертации, вносят существенный вклад в изучение процесса гормональной регуляции дыхания растений, в частности, под влиянием СК. Проведенное исследование способствует расширению представлений о возможных путях и механизмах регуляторного воздействия СК на метаболическую активность митохондрий и ее вклада в формирование защитного ответа на действие стресс-факторов. Результаты исследования, изложенные в диссертации, могут быть полезны при изучении роли митохондрий в индукции запрограммированной гибели клеток растений. Совокупность теоретических обобщений и экспериментальных данных может быть рекомендована для изучения в курсе лекций на биологических факультетах ВУЗов.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами.

Исследования проводились в период с 2011 по 2013 гг. в рамках тематических планов НИР Лаборатории дыхания растений и механизмов его регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (№ гос. регистрации 01201351461) и гранта РФФИ (№ 13-04-01828).

Личное участие автора. В диссертационной работе использованы экспериментальные данные, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками Лаборатории дыхания растений и механизмов его регуляции ИФР РАН. Автор лично участвовал в планировании и проведении всех экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке выводов, подготовке публикаций и представлении результатов на конференциях.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на: XXIV Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии» (Москва, 2012); II (X) Международной ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012); на семинаре молодых ученых в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2013); XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013); 17-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI» (Пушино, 2013); IX Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015); Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» в рамках VIII Съезда российского Общества физиологов растений (Петрозаводск, 2015); X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 3 статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 10 работ в других научных журналах и материалах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 7 глав: **введение, обзор литературы, объекты и методы исследований, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы.** Материалы диссертации изложены на 153 страницах и содержат 8 таблиц и 34 рисунка. Список цитируемой литературы включает 313 наименований, в том числе из них 280 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования являлись семядоли 4-дневных этиолированных проростков люпинов (*Lupinus luteus* L., сорт Дружный-165 и *Lupinus angustifolius* L., сорт Дикаф-14). Проращивание семян и экспонирование интактных семядолей на растворах СК проводили в термостате при +25° С, без света. Изучали влияние экзогенной СК на дыхание, активность различных путей митохондриального окисления в ткани семядолей и в выделенных из них органеллах, а также на экспрессию генов АО. Для этого семядоли, отделенные от 3,5-дневных этиолированных проростков, помещали на 12 ч. на фильтровальную бумагу пропитанную водой. Полученные интактные семядоли выдерживали 12 ч.: **1.** на растворах СК (0.5 или 1.0 мМ; рН 7.0), либо **2.** на воде (контроль, рН 7.0). Полученные таким образом контрольные семядоли также использовали в опытах для изучения влияния СК на изолированные митохондрии. В работе в качестве дополнительного объекта исследования использовали растущие и/или хранящиеся корнеплоды *Beta vulgaris* L. сорта «Верхняячская-031». Из корнеплодов получали препараты митохондрий для изучения влияния СК на метаболическую активность изучаемых органелл.

Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования с небольшими модификациями (Шугаев, Вискребенцева, 1982; Шугаев и др., 2014). Осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл стандартной реакционной среды, содержащей: 0.3 М сахарозу, 50 мМ MOPS-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА – для *L. luteus* и *L. angustifolius*, и 0.4 М сахарозу, 20 мМ TRIS-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА – для *B. vulgaris*. Выделенные митохондрии характеризовались целостностью мембран и высокой функциональной активностью.

Определение белка митохондрий проводили по методу Lowry et al. (1951).

Целостность мембран митохондрий определяли по активности сукцинат-цитохром *c*-оксидоредуктазы, а также по скорости восстановления феррицианида (Douce et al., 1973).

Определение скорости дыхания митохондрий и целых семян проводили на полярографическом приборе Oxytherm Electrode Control Unit («Hansatech Instruments», Англия), а также на полярографе LP-7 с самописцем EZ-7 («Laboratorní přístroje», Чехия) с кислородным электродом типа Кларка (Шольц, Островский, 1975). Для определения максимальной активности цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей окисления, скорости остаточного дыхания (ОД) семян и митохондрий, использовались специфические ингибиторы терминальных оксидаз: цианид калия (для цитохромоксидазы) и салицилгидроксамовая кислота (для АО). При изучении дыхания митохондрий в стандартную реакционную среду (1 мл) вносили (концентрации указаны на рисунках): MgCl₂, KН₂PO₄ (pH 7.2), АДФ, сукцинат или малат в присутствии глутамата и 0.5 мг/мл белка митохондрий.

Мембранный потенциал, генерируемый на внутренней мембране митохондрий измеряли на спектрофотометре Hitachi-557 («Hitachi», Япония) в двухволновом режиме (511 – 533 нм) с сафранином O (5.0 мкМ) в качестве потенциал-зависимого зонда (Moog, Bonner, 1982). В стандартную реакционную среду (2 мл) добавляли (концентрации указаны на рисунках): MgCl₂, KН₂PO₄, сафранин, дыхательный субстрат (сукцинат или малат), а также 0.5 мг/мл белка митохондрий.

Определение образования перекиси водорода в митохондриях проводили с использованием флуорогенного красителя 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFDA) по методу Degli-Esposti (2002) в модификации Belt et al. (2017). Митохондрии (0.5 мг/мл белка) инкубировали в стандартной реакционной среде (1 мл). Дополнительно вносили: 1.0 мМ MgCl₂, 5.0 мМ KН₂PO₄ (pH 7.2), 1.0 Е/мл пероксидаза хрена, 1.0 мкМ DCFDA, 10 мМ сукцинат, 10 мМ глутамата, а также 0.5 мМ СК. Флуоресценцию DCF регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi-850 («Hitachi», Япония), длина волны возбуждения – 480 нм, регистрации – 520 нм и рассчитывали скорость образования перекиси водорода (в относительных единицах). В контрольных опытах измерения флуоресценции DCF проводили в отсутствие субстрата дыхания. При этом скорость образования перекиси водорода митохондриями определяли разностью опытных и контрольных значений интенсивности флуоресценции DCF (Belt et al., 2017).

Геномную ДНК выделяли по методу Sambrook et al. (1989).

Выделение плазмидной ДНК проводили по методу Birnboim, Doly (1979).

Выделение РНК проводили с реактивом TRIZOL (Chomczynski, Sacchi, 1987).

Синтез кДНК осуществляли с применением набора для обратной транскрипции RevertAid M-Mul.V Reverse Transcription («Fermentas») согласно протоколу в присутствии олиго(dT)₁₈-праймеров.

Подбор праймеров (табл. 1) осуществляли с использованием программного обеспечения Unipro UGENE, Vector NTI и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Лигирование фрагментов целевых генов, полученных после ПЦР, с плазмидным вектором pTZ57R проводили с использованием набора для клонирования InsTAclon™ PCR Cloning Kit («Fermentas») согласно протоколу.

Экспрессию генов АО *L. luteus* исследовали методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров указанных в таблице 1.

Таблица 1 – Список использованных праймеров в работе по идентификации и изучению экспрессии генов белка АО *L. luteus*

	Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>A. thaliana</i>	<i>AOX1a</i>	F: 5`-ggaccacgtttgttctcgacg-3`	R: 5`-cctccaaccattccWggWacYg-3`
	<i>AOX1b</i>	F: 5`-ctgctgtgactcacagccatc-3`	R: 5`-cctccaaccattccWggWacYg-3`
	<i>AOX1c</i>	F: 5`-gcatcaaagcaagcgacatcc-3`	R: 5`-cctccaaccattccWggWacYg-3`
	<i>AOX1d</i>	F: 5`-cctacagatcgattaccgc-3`	R: 5`-cctccaaccattccWggWacYg-3`
	<i>AOX2</i>	F: 5`-cgtgagttctgttctccac-3`	R: 5`-cctccaaccattcctggactg-3`
<i>L. luteus</i>	<i>AOX1a</i>	F: 5`-gaatggaagtggaactgttc-3`	R: 5`-cggtaggccaacgaagagatt-3`
	<i>AOX1d</i>	F: 5`-catcataaacctccaattca -3`	R: 5`-gccaccgtctctagcaacat -3`
	<i>AOX2</i>	F: 5`-gatgaaaattactcggaaaga-3`	R: 5`-gaggagcttgacaatccggta-3`
	UBQ	F: 5`-agcaaaaatccaggacaagg-3`	R: 5`-tccacggagacgtaaaaca-3`

Результаты ПЦР и ОТ-ПЦР оценивали методом электрофореза в 1.0-2.0% агарозном геле, в зависимости от длины фрагментов ДНК, в присутствии EtBr (0.5 мкг/мл). Результаты гель-электрофореза оцифровывали, используя сканер-фосфоимиджер Turphoon TRIO+Variable Mode (GE Healthcare).

Определение нуклеотидной последовательности изучаемых фрагментов генов осуществляли в компании «Синтол». Секвенирование рекомбинантных векторов pTZ57R со вставками фрагментов последовательностей генов проводили с использованием праймеров M13:

F: 5'-gttgtaaacgacggccagtg-3', R: 5'-agcggataacaatttcacacagga-3'.

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программах: Unipro UGENE, Vector NTI и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Статистика. Представленные данные получены не менее чем в 3-кратной биологической и аналитической повторности. Данные на диаграммах и в таблицах выражают средние арифметические значения биологических повторностей, «±» стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение влияния СК на альтернативный путь дыхания *Lupinus luteus*

1.1. Определение нуклеотидной последовательности генов АО

Ранее нами было показано существование у *L. luteus* генов АО, как минимум из двух подсемейств: L1Aox2 и L1Aox1 (Белозёрова и др., 2014). Поскольку геном *L. luteus* не секвенирован, а АО относится к мультигенному семейству, для нас было первоочередной задачей идентифицировать гены АО *L. luteus*. С использованием ген-специфичных праймеров для пяти известных генов белка АО *A. thaliana* (табл. 1) на геномной ДНК *L. luteus* методом ПЦР нам удалось получить фрагменты 3 генов АО той же длины, что у *A. thaliana*. На рисунке 1 полученные фрагменты генов АО *L. luteus* обозначены в той же классификации, что у *A. thaliana* (рис. 1).

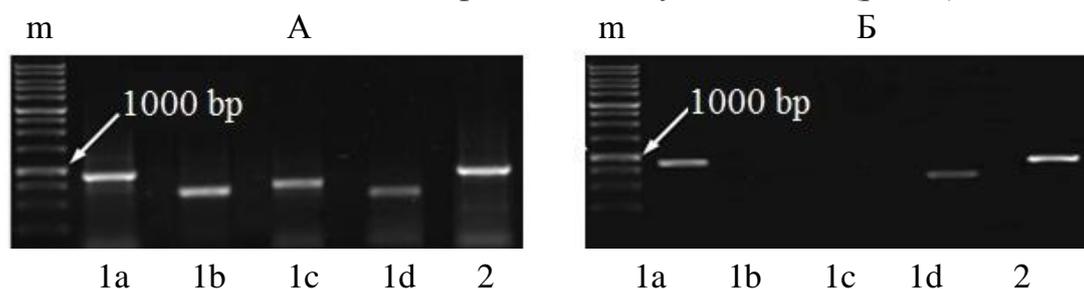


Рисунок 1 – Сравнение ампликонов ПЦР, полученных на геномной ДНК *A. thaliana* (А) и *L. luteus* (Б) с применением ген-специфичных праймеров к генам изоформ белка АО *A. thaliana* (табл. 1). Фрагменты ДНК фракционировали в 0.2% агарозном геле
Обозначения: *m* – маркер размеров фрагментов ДНК (100 bp)

Секвенирование и биоинформационный анализ показал, что идентичность нуклеотидных последовательностей фрагментов 3 выявленных генов АО *L. luteus* (*AOX1a*, *AOX1d* и *AOX2*) с генами АО *A. thaliana* составляет 100%.

1.2. Влияние СК на уровень транскриптов генов АО

Методом ОТ-ПЦР изучено влияние СК в различных концентрациях на накопление транскриптов генов АО *L. luteus* (рис. 2). Под влиянием 0.5 мМ СК содержание мРНК гена *AOX2* значительно увеличивалось по сравнению с контролем. При обработке семядолей раствором 1.0 мМ СК не было обнаружено изменений в содержании мРНК гена *AOX2*, но наблюдалось накопление транскриптов гена *AOX1a*.

Результаты содержания мРНК генов АО *L. luteus* рассчитаны в относительных единицах и нормализованы относительно уровня транскриптов референсного гена убиквитина *L. luteus* (*UBQ*).

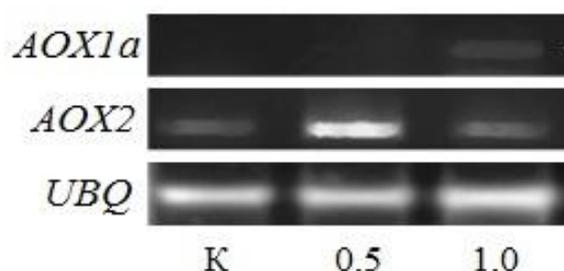


Рисунок 2 – Эффект СК на уровень транскриптов генов изоформ белка АО (*AOX1a* и *AOX2*) в интактных семядолях *L. luteus*, выдержанных 12 ч. на растворах СК (0.5 и 1.0 мМ; рН 7.0). Референсным выбран ген убиквитина *L. luteus* – *UBQ*

Таким образом, нами впервые показано, что различные концентрации СК вызывали дифференциальную экспрессию генов АО. Интересно, что под влиянием СК увеличивалось содержание мРНК не только гена *AOX1a*, гена-маркера абиотического и окислительного стресса, но также гена *AOX2*. Как правило, экспрессия генов АО из подсемейства 2 (*AOX2a* и *AOX2b* или *AOX3*) имеет конститутивный характер и зависит от типа и/или возраста ткани растений (Considine et al., 2001; Clifton et al., 2006). Тем не менее, в работе Costa et al. (2010) показано, что у 6-дневных проростков *Vigna unguiculata* L., в условиях низкой температуры, в присутствии 0.5 мМ СК или перекиси водорода, активировалась экспрессия не только гена *AOX1a*, но и гена *AOX2b*.

1.3 Изменение активности альтернативного и цитохромного путей дыхания под действием СК в ткани семядолей и в выделенных из них митохондриях

На рисунке 3 представлены обобщенные данные по дыханию семядолей *L. luteus*, которые экспонировали на растворах СК в течение 12 часов. Отмечено достоверное увеличение активности АП при действии различных концентраций фитогормона на фоне снижения скорости дыхания по ЦП по сравнению с контролем.

После 12 часовой экспозиции семядолей на растворах СК происходило увеличение активности АП на 30% при концентрации СК 0.5 мМ, и почти на 80% при действии 1.0 мМ концентрации фитогормона. Снижение активности ЦП составило соответственно 12% и 53% по сравнению с контролем (рис. 3).

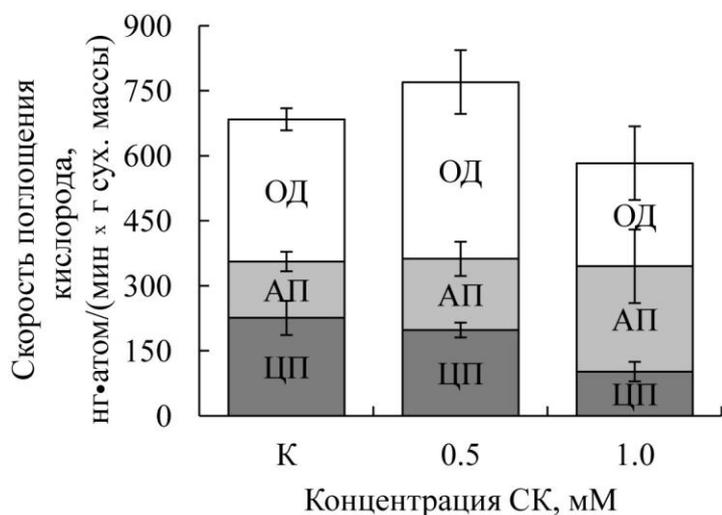


Рисунок 3 – Изменение скорости дыхания и соотношение основных путей окисления в ткани семядолей *L. luteus* после экспонирования семядолей в течение 12 ч на СК (0.5 и 1.0 мМ; pH 7.0)
 Обозначения: К – контроль (экспонирование на воде), ЦП – цитохромный путь, АП – альтернативный путь, ОД – остаточное дыхание

При изучении активности различных путей окисления в митохондриях, изолированных из семядолей *L. luteus*, подвергнутых действию СК, обнаружено, что 0.5 мМ СК не изменяла активность ЦП окисления по сравнению с контролем (рис. 4). Более того, нами обнаружены различия в действии СК на активность ЦП в интактных семядолях (ингибирование) и в выделенных из них митохондриях (без изменений к контролю; рис. 3 и 4). Наиболее вероятным объяснением этому эффекту является обратимость ингибиторного действия СК на основной путь переноса электронов - ЦП, которое нивелируется в процессе выделения органелл (Norman et al., 2004).

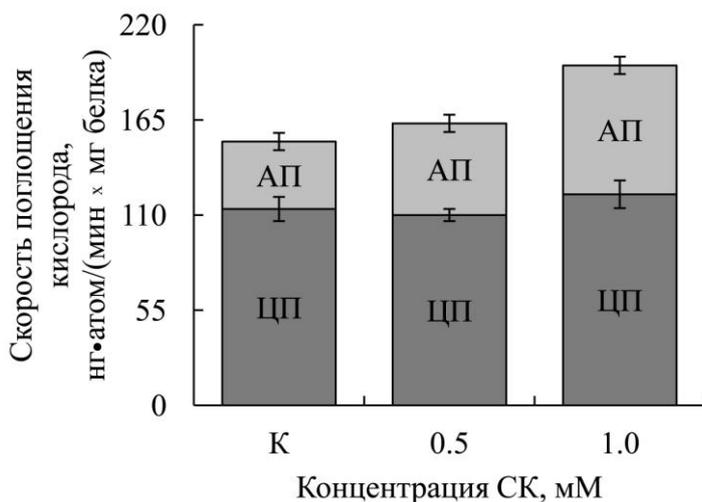


Рисунок 4 – Изменение скорости дыхания и соотношение основных путей окисления в митохондриях, выделенных из семядолей проростков *L. luteus* после их экспонирования в течение 12 ч на СК (0.5 и 1.0 мМ; рН 7.0)
 Обозначения: К – контроль (экспонирование на воде), ЦП – цитохромный путь, АП – альтернативный путь

При этом действие более низкой концентрации СК (0.5 мМ) вызывало уже заметное увеличение активности АП (на 45%) в митохондриях. Обработка семядолей 1.0 мМ СК приводила к увеличению активности АП в изолированных из них митохондриях в 2 раза (рис. 4). Таким образом, полученные результаты согласуются с приведенными данными по влиянию СК на активность АП в ткани семядолей *L. luteus*. Аналогичные данные об увеличении активности АП при действии 0.5-1.0 мМ СК получены на других объектах (Clifton et al., 2006; Fung et al., 2006). Отметим, что повышение под влиянием 0.5 мМ СК максимальной активности (или мощности) АП дыхания, как в интактных семядолях, так и в выделенных из них митохондриях, сопровождалось заметной активацией экспрессии гена *AOX2*, определяемой по увеличению содержания мРНК этого гена (рис. 3 и 4).

2. Изучение влияния СК на метаболическую активность митохондрий растений

2.1. Влияние СК на окисление дыхательных субстратов

Результаты опытов по влиянию СК в различных концентрациях на окисление малата (в присутствии глутамата) митохондриями, выделенными из хранящихся корнеплодов *B. vulgaris* в различных метаболических состояниях суммированы на рисунке 5А. Видно, что в низкой концентрации СК разобщает дыхание митохондрий, что проявляется в увеличении скорости окисления субстрата в состоянии V_4 . Разобщающий эффект СК усиливался по мере увеличения ее концентрации, достигая максимума при 0.8-1.4 мМ СК. При этом скорость дыхания митохондрий в состоянии V_4 увеличивалась в 2 раза. Однако следует отметить, что это разобщение не было полным, поскольку скорость разобщенного дыхания была ниже скорости поглощения кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии (V_3) в присутствии АДФ. Последующее увеличение концентрации СК приводило уже к снижению стимулирующего влияния фитогормона на скорость дыхания в состоянии V_4 . Очевидно, это связано с тем, что при увеличении концентрации СК (выше 2.0 мМ) происходило существенное ингибирование окисления малата в состоянии V_3 (рис. 5А). Разобщающее действие СК (0.5 мМ) сопровождалось снижением величины ДК и отношения АДФ/О, т.е. ослаблением прочности сопряжения процессов окисления и фосфорилирования и снижением эффективности синтеза АТФ (табл. 2).

Аналогичные результаты получены при титровании СК окисления сукцината в митохондриях *B. vulgaris* (данные не приведены).

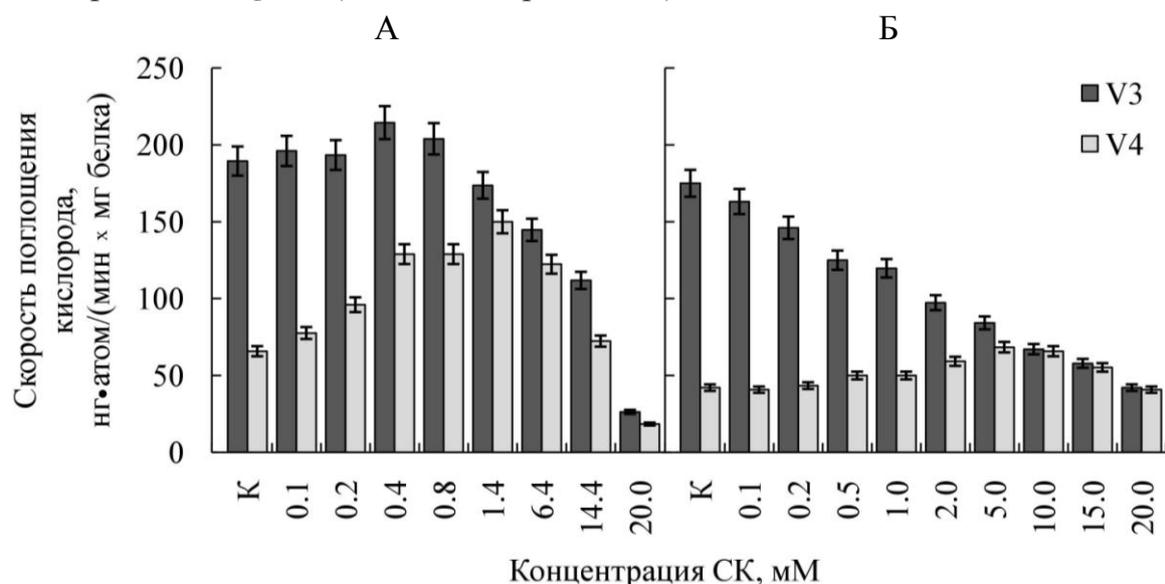


Рисунок 5 – Влияние СК на скорость поглощения кислорода митохондриями *B. vulgaris* (А) и *L. luteus* (Б) при окислении малата с глутаматом в разных метаболических состояниях

Примечание: митохондрии инкубировали 2 мин в стандартной реакционной среде (1 мл) с добавлением $MgCl_2$ (1.0 мМ), KH_2PO_4 (5.0 мМ), в присутствии малата (10 мМ), глутамата (10 мМ), а также указанных конечных концентраций СК без АДФ (V_4) и в присутствии 0.5 мМ АДФ (V_3). Обозначения: К-контроль

Таблица 2 – Влияние СК на параметры окислительного фосфорилирования при окислении малата и глутамата митохондриями *B. vulgaris* и *L. luteus*

Митохондрии	Варианты	Состояние V_3	Состояние V_4	ДК	АДФ/О
<i>B. vulgaris</i>	Контроль	172 ± 38	49 ± 8	3.5 ± 1.3	2.9 ± 0.1
	0.5мМ СК	183 ± 27	70 ± 11	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.3
<i>L. luteus</i>	Контроль	177 ± 14	43 ± 3	4.1 ± 0.4	2.8 ± 0.1
	0.5мМ СК	125 ± 16	49 ± 4	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.1

Примечание: В стандартную реакционную среду (1 мл) вносили 1.0 мМ $MgCl_2$, 5.0 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ малат, 10 мМ глутамат, 0.5 мМ СК и 200 мкМ АДФ (V_3).

Скорости окисления субстратов выражены в нг•атомах кислорода /(мин x мг белка митохондрий)

При титровании СК окисления малата в митохондриях *L. luteus* обнаружено, что только при использовании высоких ее концентраций (0.5-5.0 мМ) проявлялся эффект разобщения, когда наблюдалось ускорение дыхания в состоянии V_4 (рис. 5Б). При этом существенно снижалась величина ДК и отношение АДФ/О (табл. 2). В то же время окисление субстрата в состоянии V_3 митохондрий *L. luteus* оказалось более чувствительным к действию СК, чем у митохондрий *B. vulgaris*, и ингибировалось в присутствии уже низких концентраций СК (0.05-0.1мМ). Аналогичные результаты были получены при титровании СК окисления сукцината (рис. 6).

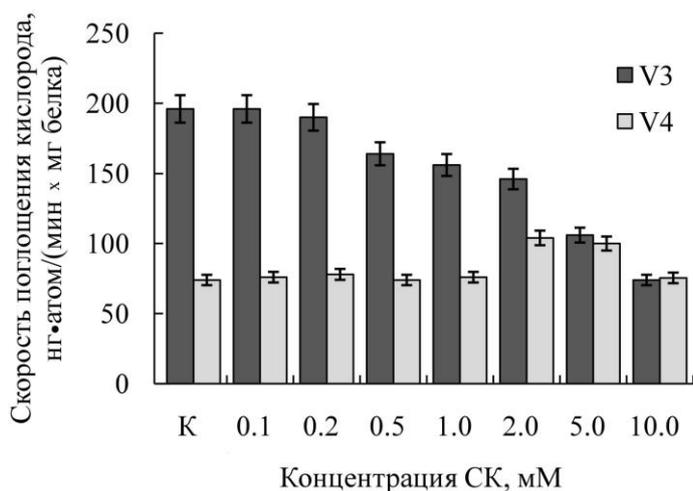


Рисунок 6 – Влияние СК на скорость поглощения кислорода митохондриями *L. luteus* при окислении сукцината в разных метаболических состояниях
 Примечание: митохондрии инкубировали 2 мин в стандартной реакционной среде (1 мл) с добавлением $MgCl_2$ (1.0 мМ), KH_2PO_4 (5.0 мМ), сукцината (10 мМ), глутамата (10 мМ), а также с СК без АДФ (V_4) и в присутствии 0.5 мМ АДФ (V_3). Обозначения: К-контроль

В ходе дальнейших экспериментов было обнаружено, что реакция митохондрий на действие СК зависела также от длительности инкубации органелл в присутствии фитогормона. Как показано на рисунке 7, при продолжительной (8-10 мин) инкубации митохондрий *B. vulgaris* в присутствии повышенных концентраций СК (выше 1.0 мМ) скорость окисления малата с глутаматом в состоянии V_4 не оставалась постоянной, причем характер изменений зависел от концентрации фитогормона. Чем выше концентрация СК, тем сильнее разобщающий эффект и тем быстрее он снижался. При концентрации СК 0.5–1.0 мМ снижение ее разобщающего действия на дыхание митохондрий в пределах 10 мин не наблюдалось.

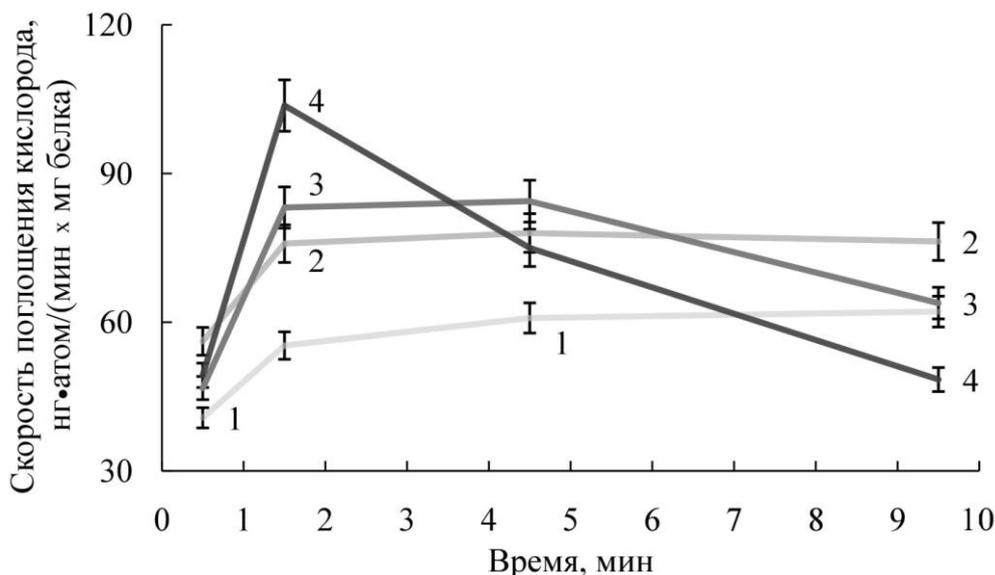


Рисунок 7 – Динамика изменений скорости окисления малата и глутамата в митохондриях *B. vulgaris* под влиянием различных концентраций СК
 Примечание: условия измерений и концентрации субстратов как на рисунке 5.
 Обозначения: 1 – 0.5 мМ, 2 – 1.0 мМ, 3 – 2.0 мМ, 4 – 5.0 мМ СК

Таким образом, наряду с концентрацией, продолжительность действия СК на митохондрии растений может играть важную роль в регуляции их метаболизма.

Полученные нами результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные о том, что различные концентрации СК могут оказывать разобщающее и/или ингибирующее действие на дыхание митохондрий растений (Norman et al., 2004). Кроме того, характер изменений скорости дыхания под влиянием СК зависел от длительности инкубации органелл в присутствии ее различных концентраций. Немаловажный факт, это функциональное состояние митохондрий, выделенных из различных объектов.

2.2. Влияние СК на генерацию мембранного потенциала

Влияние СК на генерацию $\Delta\Psi$ изучали в тех же экспериментальных условиях, что и дыхание митохондрий. В митохондриях *B. vulgaris* низкие концентрации СК (ниже 0.1 мМ) не оказывали существенного влияния на величину $\Delta\Psi$. В концентрации 0.5 мМ СК вызывала уже заметное снижение величины $\Delta\Psi$ (рис. 8А). Это снижение, очевидно, обусловлено разобщающим действием СК на дыхание митохондрий *B. vulgaris* (рис. 5А). Дальнейшее увеличение концентрации СК в среде инкубации приводило к значительной диссипации $\Delta\Psi$ (рис. 8А), что коррелировало с ингибированием фосфорилирующего дыхания митохондрий в состоянии V_3 (рис. 5А).

Аналогичные результаты получены на митохондриях *L. luteus* и представлены на рисунке 8Б. Видно, что величина $\Delta\Psi$ быстро снижалась при каждой последующей добавке СК, увеличивающей ее суммарную концентрацию в реакционной среде. Однако в отличие от митохондрий *B. vulgaris* в митохондриях *L. luteus* снижение $\Delta\Psi$ при добавке 0.5-1.0 мМ СК было связано, по всей вероятности, не только с разобщающим, но также с ее ингибирующим действием на дыхательную цепь. Действительно, указанные концентрации СК незначительно стимулировали окисление в состоянии V_4 , но существенно ингибировали дыхание митохондрий в состоянии V_3 (рис. 5Б). Таким образом, полученные результаты по действию СК на генерацию $\Delta\Psi$ согласуются с результатами полярографических исследований.

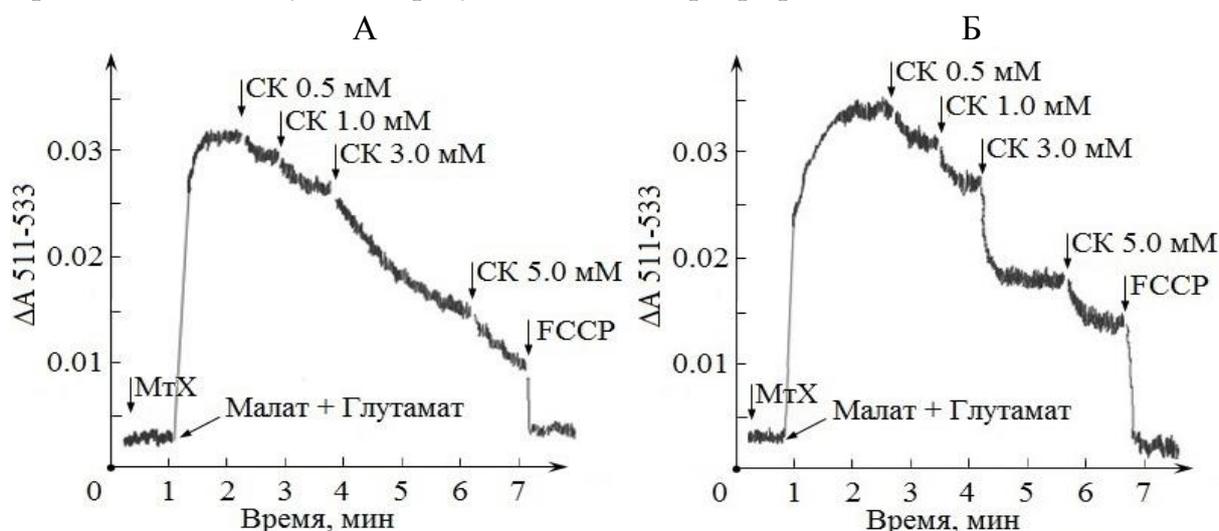


Рисунок 8 – Диссипация мембранного потенциала под влиянием увеличивающихся концентраций СК в митохондриях *B. vulgaris* (А) и *L. luteus* (Б)

Примечание: в стандартную реакционную среду (2 мл) к митохондриям (МтХ) вносили $MgCl_2$ (1.0 мМ), KH_2PO_4 (5.0 мМ), малат (10 мМ), глутамат (10 мМ), а также СК в указанных концентрациях и FCCP (2.0 мкМ)

Анализируя полученные результаты, отметим, что дыхание митохондрий в состоянии V_3 существенно ингибировалось при повышении концентрации СК. Это может иметь важное регуляторное значение. В частности, обнаруженная нами активация под влиянием 0.5-1.0 мМ СК экспрессия генов АО *L. luteus*, вероятно обусловлена прямым ингибированием СК активности основной ЭТЦ митохондрий. Аналогичное антимицин А-подобное стимулирующее действие СК на экспрессию генов АО показано на клетках и растениях *Nicotiana tabacum* L., *A. thaliana* (Chivasa et al., 1997; Norman et al., 2004; Clifton et al., 2005, 2006; Amirsadeghi et al., 2006).

2.3. Влияние СК на проницаемость митохондриальной сопрягающей мембраны

Как видно на рисунке 9 митохондрии *L. angustifolius* были способны генерировать, а также устойчиво поддерживать $\Delta\Psi$ при окислении сукцината в течение длительного времени (более 40 мин), как за счет функционирования электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), так и за счет гидролиза эндогенной АТФ при торможении работы дыхательной цепи, например, в условиях анаэробноза. В последнем случае быстрая и полная диссипация $\Delta\Psi$ наблюдалась под влиянием не только разобщителя окислительного фосфорилирования (FCCP), но и ингибитора АТФазы (олигомицина). Наблюдаемое незначительное снижение стационарной величины $\Delta\Psi$, после некоторого интервала времени (лаг-периода) длительностью 8-10 мин, было обусловлено исчерпанием кислорода и переходом к поддержанию энергизации мембраны за счет гидролиза эндогенной АТФ, на что указывало появление чувствительности $\Delta\Psi$ к олигомицину (рис. 9).

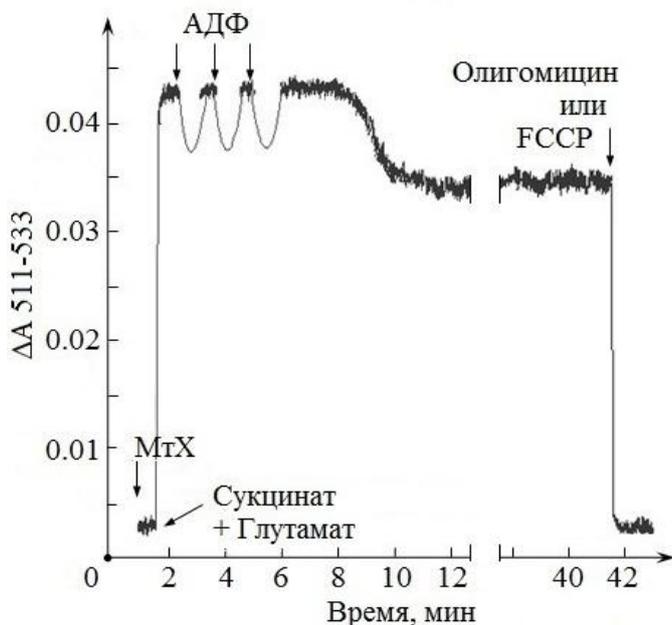


Рисунок 9 – Генерация и поддержание мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий *L. angustifolius* при окислении сукцината в аэробных условиях, а также за счет гидролиза эндогенной АТФ в условиях анаэробноза
Примечание: в стандартную реакциюную среду (2 мл) к митохондриям (МтХ) вносили $MgCl_2$ (1.0 мМ), KH_2PO_4 (5.0 мМ), сукцинат (10 мМ), глутамат (10 мМ), АДФ (100 мкМ), FCCP (0.5 мкМ), олигомицин (20 мкМ)

Кроме того, уровень кислорода в среде инкубации митохондрий был проверен с использованием кислородного электрода. Показано, что скорость дыхания митохондрий при окислении сукцината была достаточно высокой для того, чтобы в течение короткого интервала времени, равного лаг-периоду в опытах по генерации $\Delta\Psi$, привести к возникновению в ячейке условий анаэробноза (рис. 10, кривая 2).

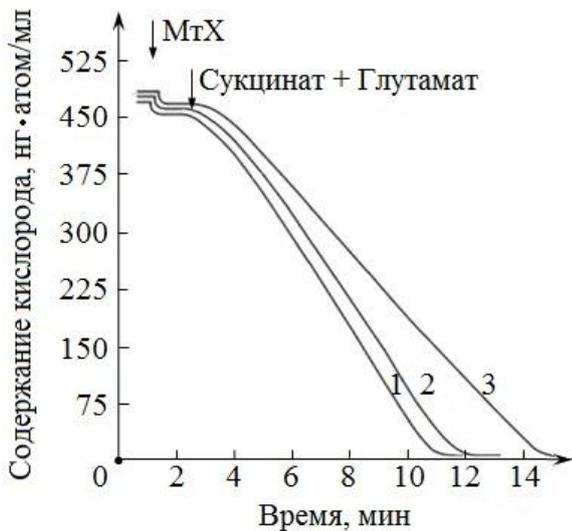


Рисунок 10 – Влияние СК на скорость поглощения кислорода митохондриями *L. angustifolius* при окислении сукцината в состоянии V_4

Примечание: стандартная реакционная среда инкубации (1 мл) в присутствии 0.5 мМ и 3.0 мМ СК (кривые 1, 3) и в ее отсутствие (кривая 2)

Далее нами было изучено влияние длительной инкубации дышащих митохондрий *L. angustifolius* в присутствии СК на генерацию $\Delta\Psi$ и возможность индукции РТР. Отметим, что при выборе действующих концентраций фитогормона в этих опытах нами было учтено, что только относительно высокие концентрации СК (0.5–1.0 мМ) оказывали заметное влияние на метаболическую активность митохондрий (рис. 5Б и 6). Кроме того, судя по литературным данным, именно такие концентрации СК могут эффективно индуцировать РТР при окислении сукцината в митохондриях животных (печень крысы), что сопровождается полной диссипацией $\Delta\Psi$ и набуханием органелл (Battaglia et al., 2005).

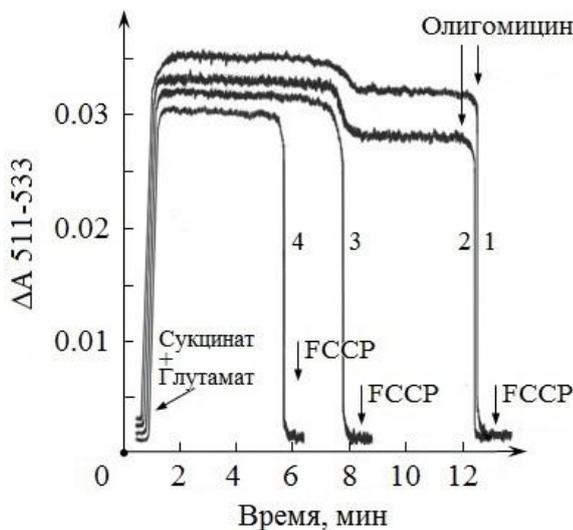


Рисунок 11 – Влияние СК на генерацию мембранного потенциала при окислении сукцината митохондриями *L. angustifolius*

Примечание: стандартная реакционная среда (2 мл), в присутствии экзогенной АТФ (0.5 мМ), а также 0.5 мМ СК (кривая 3), 3.0 мМ СК (кривая 4), 0.5 мМ СК + 2.0 мМ ДТТ (кривая 2) или в отсутствие СК (кривая 1).

Дополнительно вносили, где указано: сукцинат (10 мМ), глутамат (10 мМ), олигомицин (20 мкМ) и FCCP (0.5 мкМ)

На рисунке 11 (кривая 3) показано, что присутствие 0.5 мМ СК вызывало некоторое снижение $\Delta\Psi$, и оставался неизменным в течение лаг-периода. После чего наблюдалась быстрая и полная диссипация $\Delta\Psi$. В параллельных опытах было установлено, что длительность лаг-периода равна интервалу времени, необходимому для практически полного исчерпания кислорода митохондриями в среде инкубации при окислении сукцината (рис. 10, кривая 1). Однако в присутствии СК диссипация $\Delta\Psi$ уже не предотвращалась наличием в среде инкубации АТФ (рис. 11, кривая 3).

При этом длительность лаг-периода зависела от ряда факторов, в частности, от концентрации СК. При использовании 0.05-0.1 мМ СК для индукции проницаемости внутренней мембраны митохондрий *L. angustifolius* требовалась дополнительная 10-15 мин прединкубация дышащих митохондрий с фитогормоном (данные не приведены). Тогда как при использовании высокой концентрации СК (3.0 мМ), оказывающей ингибирующее действие на окисление сукцината (рис. 6), наблюдалось сокращение лаг-периода до момента резкого увеличения проницаемости внутренней мембраны для протонов (рис. 11, кривая 4). Очевидно, что в этих условиях СК-индуцируемая деполяризация внутренней мембраны происходила в условиях аэробноза, что подтверждено с помощью кислородного электрода (рис. 10, кривая 3).

Следует отметить, что приведенные в диссертации и опубликованные данные, свидетельствуют о том, что в условиях анаэробноза, когда $\Delta\Psi$ поддерживался за счет гидролиза эндогенной или экзогенной АТФ, СК не индуцировала деполяризацию внутренней мембраны митохондрий (Шугаев и др., 2016). Эти данные показывают, что для проявления рассматриваемого эффекта СК, необходимым условием является предварительная инкубация дышащих митохондрий с фитогормоном.

Предполагая, что обнаруженная в нашей работе СК-индуцируемая деполяризация внутренней мембраны митохондрий *L. angustifolius* могла быть обусловлена открытием в ней поры неспецифической проницаемости (РТР), мы исследовали влияние на нее циклоспорина (ЦсА) – известного ингибитора РТР в митохондриях животных. Оказалось, что присутствие ЦсА при инкубации митохондрий, выделенных из *L. angustifolius*, не оказывало влияния на процесс пермеабиллизации внутренней мембраны под влиянием СК (данные не приведены). При совместном использовании ЦсА и восстановителя – дитиотреитола (ДТТ), т.е. в условиях, при которых ингибировалась индукция РТР в митохондриях *Solanum tuberosum* L. (Arpagaus et al., 2002), мы наблюдали существенное ингибирование СК-индуцированной диссипации $\Delta\Psi$. Кроме того, при инкубации митохондрий в присутствии одного лишь ДТТ также вызывало ингибирование деполяризации внутренней мембраны митохондрий под влиянием СК (рис. 11, кривая 2). Не исключено, что показанное ранее в ряде работ ингибирование индукции РТР в митохондриях растений под влиянием ЦсА в присутствии ДТТ обусловлено действием восстановителя, а не ЦсА.

Известно, что увеличение устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды под воздействием СК опосредовано повышением в клетках и митохондриях уровня АФК (Vlot et al., 2009; Nie et al., 2015). Как уже отмечалось выше, индукция РТР в митохондриях животных под влиянием СК была обусловлена возникновением окислительного стресса и ингибировалась в присутствии антиоксидантов и/или восстановителей, в том числе ДТТ (Battaglia et al., 2005).

С целью выявления возможного механизма действия СК на проницаемость внутренней мембраны митохондрий *L. angustifolius* мы изучили влияние на нее фениларсен-оксида (ФАО) – прооксиданта, имитирующего окислительный стресс, влияющего на тиоловые группы белков и индуцирующего РТР в митохондриях как

животных, так и растений (Arpagaus et al., 2002; Battaglia et al., 2005; Halestrap, 2009). Было обнаружено, что при окислении сукцината, присутствие в среде инкубации ФАО вызывало после некоторого времени полную деполяризацию внутренней мембраны, подобно действию СК (рис. 12). Однако после внесения восстановителя (ДТТ) мы наблюдали восстановление $\Delta\Psi$, а также его поддержание в течение длительного времени за счет гидролиза АТФ, чувствительного к действию олигомицина (рис. 12). По данным литературы, индукция РТР в митохондриях животных, как правило, сопровождается диссипацией $\Delta\Psi$ и высокоамплитудным набуханием органелл, ведущим к повреждению внешней мембраны и выходу из межмембранного пространства цитохрома *c* и других проапоптотических белков (Kroemer et al., 2007; Halestrap, 2009; Bernardi, 2013). Что касается митохондрий растений, то здесь ситуация неоднозначная. В ряде работ обнаружена взаимосвязь между индукцией РТР и набуханием митохондрий (Virolainen et al., 2002; Arpagaus et al., 2002), однако в других исследованиях этого не наблюдалось (Vianello et al., 1995). В используемых нами условиях, длительная (до 30 мин) инкубация митохондрий *L. angustifolius* в низкосолевого (сахарозной) среде с деполяризованной под влиянием СК внутренней мембраной, не сопровождалась ни набуханием (данные приведены в диссертации), ни существенным нарушением целостности внешней мембраны органелл (табл. 3).

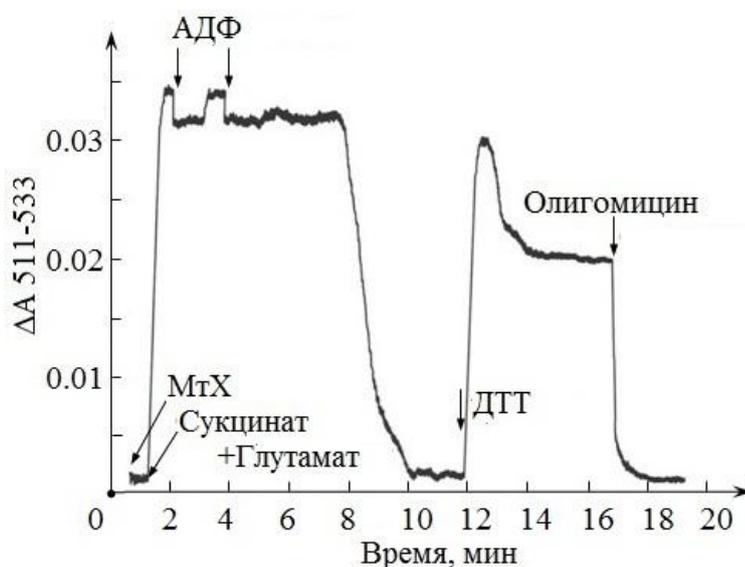


Рисунок 12 – Диссипация мембранного потенциала в митохондриях *L. angustifolius* в присутствии ФАО и его восстановление под влиянием ДТТ
Примечание: стандартная реакционная среда инкубации (2 мл) как на рисунке 9, в присутствии 50 мкМ ФАО. Дополнительно вносили, где указано: АДФ (0.1 мМ), ДТТ (2.0 мМ), олигомицин (20 мкМ)

Аналогичные результаты по влиянию СК на проницаемость внутренней мембраны были получены на митохондриях, выделенных из растущих корнеплодов *B. vulgaris* (данные приведены в диссертации). Показано, что внесение 1.0 мМ СК в среду инкубации митохондрий энергизованных при окислении сукцината, содержащую эндогенную (синтезированную из АДФ и Φ_n) или экзогенную АТФ, вызывало, после краткого временного интервала времени быструю диссипацию $\Delta\Psi$. При этом, как и в митохондриях *L. angustifolius*, диссипация $\Delta\Psi$ под влиянием СК в митохондриях *B. vulgaris* ингибировалась в присутствии ДТТ.

Таблица 3 – Влияние СК-индуцируемой деполяризации внутренней мембраны на интактность внешней мембраны митохондрий *L. angustifolius*

Митохондрии	Интактность внешней мембраны (%)
Контроль	90 ± 5
СК	84 ± 4

Примечание: индукция РТР в митохондриях под влиянием 0.5 мМ СК регистрировалась по деполяризации внутренней мембраны в анаэробных условиях в присутствии экзогенной АТФ. После инкубации в течение 30 мин митохондрии осаждали центрифугированием и ресуспендировали в стандартной реакционной или гипотонической (без сахарозы) среде. В качестве контроля использовали свежесыведенные препараты митохондрий

Анализируя полученные в работе результаты, мы полагаем, что пермеабиллизация внутренней мембраны митохондрий исследуемых растений происходила вследствие открытия в ней специального разобщающего канала (назовем его МРК), функционирование которого удалось зарегистрировать благодаря невозможности поддержания в этих условиях генерации $\Delta\Psi$ за счет гидролиза АТФ.

При этом было установлено, что функционирование МРК характеризовалось: а) легкой обратимостью, т.е. переходом из открытого состояния в закрытое; б) высокой проницаемостью для протонов, хотя, не исключено, что он может быть проницаем для небольших катионов (K^+ , Ca^{2+} и др.); в) активация разобщающего канала не ингибировалась ЦсА (в отсутствие ДТТ); г) в низкосолевого (сахарозной) среде активация МРК не сопровождалась набуханием митохондрий и существенным нарушением целостности внешней мембраны. Более того, функционирование МРК оказалось редокс-чувствительным и регулировалось восстанавливающими (ДТТ) и окисляющими (ФАО) тиоловые группы белков агентами (Шугаев и др., 2016).

На основании полученных результатов можно также предположить, что обнаруженный феномен увеличения протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий семядолей проростков *L. angustifolius* под влиянием СК по всем этим ключевым параметрам соответствовал активации РТР в митохондриях животных, функционирующей в подсостоянии низкой проводимости, как ионного (протонного или катионного) разобщающего канала (Icha, Mazat, 1998). Однако для окончательного выяснения вопроса о том является ли МРК подсостоянием РТР, необходимы дополнительные исследования, проводимые нами в настоящее время.

3. Влияние СК на образование перекиси водорода в митохондриях

Полученные в предыдущем разделе результаты свидетельствуют о том, что СК-индуцируемая пермеабиллизация внутренней мембраны митохондрий *B. vulgaris* и *L. angustifolius*, могла быть опосредована повышением скорости образования АФК этими органеллами и возникновением окислительного стресса. В этой связи представляют интерес данные о резкой активации образования АФК, а именно перекиси водорода, в митохондриях *A. thaliana* под влиянием СК (Belt et al., 2017).

С использованием аналогичной методики мы исследовали влияние СК на скорость образования перекиси водорода в митохондриях *L. angustifolius* (рис. 13). Судя по полученным данным, при окислении сукцината СК активировала образование перекиси водорода митохондриями *L. angustifolius*, примерно в 2.5-3.0 раза (разница между вариантом 1 и вариантом 4). Следует также отметить, что более низкие концентрации СК (0.05-0.1 мМ) также существенно увеличивали образование АФК митохондриями *L. angustifolius* (данные не приведены).

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с данными литературы (Gleason et al., 2011; Nie et al., 2015; Belt et al., 2017) и показывают, что в митохондриях *L. angustifolius* СК в широком диапазоне концентраций существенно активирует генерацию перекиси водорода при окислении сукцината. Это может, при определенных условиях оказывать серьезное негативное влияние на функционирование митохондрий, включая пермеабиллизацию внутренней мембраны этих органелл. С другой стороны, в последнее время показана важная роль сукцинат-зависимой генерации перекиси водорода митохондриями, как возможного пути передачи регуляторного сигнала СК при формировании адаптивной ответной реакции растений на действие неблагоприятных условий окружающей среды (Gleason et al., 2011; Nie et al., 2015; Jardim-Messeder et al., 2015; Huang et al., 2016; Belt et al., 2017).

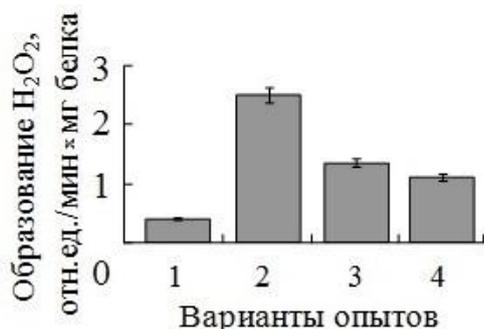


Рисунок 13 – Влияние СК на скорость образования перекиси водорода митохондриями *L. angustifolius* при окислении сукцината

Примечание: варианты опытов (пояснение в тексте):

- 1 - митохондрии + сукцинат;
- 2 - митохондрии + сукцинат + СК (0.5мМ);
- 3 - митохондрии + СК (0.5 мМ);
- 4 - вариант 2 минус вариант 3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе изучено прямое и опосредованное (через геном) регуляторное воздействие СК на работу митохондрий растений. Впервые показано, что выдерживание семядолей *L. luteus* в присутствии 0.5 мМ СК приводило к накоплению транскриптов гена *AOX2*, а в присутствии 1.0 мМ СК - гена *AOX1a* (Буцанец и др., 2018). Известно, что индукция гена *AOX1a* у растений проявлялась, обычно, в условиях стресса, а также при действии СК, АФК и ингибиторов ЭТЦ (Clifton et al., 2005, 2006; Vanlerberghe, 2013). Трудно сказать, что является причиной активации экспрессии двух генов АО в семядолях *L. luteus* под влиянием различных концентраций СК. Однако подобного типа экспрессия генов *AOX1a* и *AOX2b* наблюдалась при действии СК, холода и перекиси водорода на листья проростков *V. anguiculata* (Costa et al., 2010), а также в процессе созревания и при прорастании семян ряда растений (Saisho et al., 2001b; Macherel et al., 2007; Costa et al., 2009).

Важно отметить, что накопление транскриптов генов АО сопровождалось активацией АП окисления, как в ткани интактных семядолей, обработанных фитогормоном, так и в изолированных из них митохондриях.

Полученные в работе результаты также показали, что, наряду с индукцией ряда генов, кодирующих защитные белки митохондрий, СК способна прямо модулировать метаболическую активность этих органелл, оказывая влияние практически на все основные их функции: скорость окисления дыхательных субстратов, эффективность окислительного фосфорилирования, активность различных путей окисления в ЭТЦ, величину $\Delta\Psi$, скорость образования АФК (перекиси водорода) и проницаемость внутренней мембраны. Известно, что из-за разнообразия и разнонаправленности регуляторного действия, СК называют «гормоном со многими лицами» (Vlot et al., 2009). Полученные в работе результаты, показывают, что двойное действие СК проявлялось и на уровне митохондрий. Например, СК ускоряла (разобщала) дыхание митохондрий в состоянии V_4 и ингибировала его в состоянии V_3 . Кроме того, СК увеличивала образование перекиси водорода митохондриями и одновременно активировала АП окисления в ЭТЦ, который препятствует избыточной генерации АФК. При этом нами впервые показано, что сила и характер влияния СК на дыхание митохондрий зависит не только от концентрации фитогормона, но также от времени экспозиции органелл в ее присутствии и состояния митохондрий (Шугаев и др. 2014).

Несомненно, ряд вопросов, касающихся гормональной регуляции дыхания растений, в том числе, затрагиваемых в данной работе, требуют дополнительных исследований. Вместе с тем, анализ полученных нами и имеющихся в литературе данных, позволяют предложить следующую рабочую модель участия митохондрий в формировании СК-индуцируемых защитных механизмов у растений при действии различных стресс-факторов. Прежде всего, показано, в том числе и в данной работе, что при накоплении СК в клетке в условиях стресса, она активирует образование перекиси водорода в митохондриях, которая является вторичным посредником передачи сигнала фитогормона (Буцанец и др., 2018; Gleason et al., 2011; Belt et al., 2017). Повышение уровня АФК индуцирует экспрессию ядерных генов, кодирующих АО, с последующей активацией АП окисления в ЭТЦ митохондрий. Как известно, активация АП окисления играет ключевую роль в регуляции, по типу обратной связи, скорости образования АФК митохондриями и поддержания редокс-гомеостаза клетки в условиях стресса (Cvetkovska, Vanlerberghe, 2013; Huang et al., 2016). Не менее важна роль АО в поддержании окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий в условиях стресса, когда активность основного цитохромного пути окисления в ЭТЦ, как правило, заторможена (Vanlerberghe, 2013). Высказывается предположение (Belt et al., 2017), что сигнал, поступающий от СК, который связан с повышением уровня АФК в митохондриях, специфичен для активации экспрессии лишь определенных редокс-чувствительных защитных генов ядерного кодирования, которые не могут быть активированы при передаче сигнала СК другими путями, например, с участием рецепторов для данного фитогормона (NPR1, 3 и 4). Поэтому, изменения в метаболизме митохондрий под

влиянием сравнительно низких концентраций СК, связанная, прежде всего, с активацией АП окисления, будет поддерживать энергетику и редокс-гомеостаз клеток в условиях стресса, способствуя, тем самым, устойчивости растений. Однако в случае если антиоксидантная защита не срабатывает, по тем или иным причинам, то в митохондриях возникает окислительный стресс, связанный с дальнейшим накоплением СК. В этом случае СК способна ингибировать активность ЭТЦ, а также ключевые антиоксидантные ферменты (в частности, каталазу и аскорбатпероксидазу), что ведет к повышению уровня АФК в митохондриях и клетке (Norman et al., 2004; Kawano, Bouteau, 2013; Nie et al., 2015). Кроме того, как впервые показано в данной работе, СК может индуцировать АФК-зависимую пермеабиллизацию внутренней мембраны митохондрий растений для протонов, по-видимому, вследствие открытия в ней РТР (в состоянии низкой проводимости) или какого-то другого канала, проницаемого для низкомолекулярных катионов, функционирование которого приводит к полной деполяризации внутренней мембраны митохондрий. Ранее способность СК индуцировать открытие РТР в условиях окислительного стресса была показана на митохондриях животных (Battaglia et al., 2005). Очевидно, что такая дисфункция митохондрий, а именно, полная потеря способности к синтезу АТФ, должна в течение короткого времени привести клетку к гибели (Mur et al., 2008). Пока не ясно, каким путем будет проходить этот процесс, но предполагается, что в растениях, как и в животных, могут иметь место процессы аутофагии, некроза или апоптозо-подобной программируемой смерти клеток, протекающей, вероятно, с участием митохондрий (Van Aken, Van Breusegem, 2015). При этом локальная гибель клеток в месте проникновения паразита, может рассматриваться как СК-индуцируемый иммунный ответ растений, проявляющийся, например, в ходе реакции сверхчувствительности (Mur et al., 2008).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о множественности путей регуляторного воздействия СК на метаболическую активность митохондрий, которое приводит к важным последствиям для развития устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы три ядерных гена альтернативной оксидазы в семядолях проростков *L. luteus* (*AOX1a*, *AOX1d* и *AOX2*) и впервые показана дифференциальная регуляция их экспрессии в зависимости от концентрации салициловой кислоты: 0.5 мМ увеличивала накопление транскриптов гена *AOX2*, тогда как при 1.0 мМ происходило накопление транскриптов гена *AOX1a*, который является одним из генов-маркеров окислительного стресса.
2. Прослежена вся цепочка регуляторного действия салициловой кислоты на альтернативный путь дыхания в семядолях *L. luteus* от накопления транскриптов генов до увеличения мощности альтернативного дыхания, как в ткани семядолей, обработанных фитогормоном, так и в изолированных из них митохондриях.

3. Впервые показано, что характер регуляторного действия салициловой кислоты на метаболизм изолированных митохондрий растений (разобщение и/или ингибирование дыхания) зависит не только от ее концентрации, но и от времени инкубации органелл в ее присутствии, что, по-видимому, указывает на способность митохондрий активно ее поглощать.

4. Впервые показано, что при инкубации с сукцинатом митохондрий растений салициловая кислота способна обратимо индуцировать протонную проницаемость внутренней мембраны, по-видимому, вследствие открытия редокс-чувствительного разобщающего канала (МРК).

5. Показано, что при окислении сукцината в митохондриях семядолей *L. angustifolius* салициловая кислота существенно увеличивала образование перекиси водорода, что является необходимым условием индукции протонной проницаемости внутренней мембраны этих органелл.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Белозерова Н.С., Baik А.С., Буцанец П.А., Кузнецов В.В., Шугаев А.Г., Пожидаева Е.С. (2014) Влияние салициловой кислоты на альтернативный путь дыхания люпина желтого // Физиология растений Т. 61 С.43-52.

2. Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А. (2014) Влияние салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий растений // Физиология растений Т. 61 С. 555-564.

3. Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Шугаева Н.А. (2016) Салициловая кислота индуцирует протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина // Физиология растений Т. 63 С. 765-776.

Статьи в других рецензируемых журналах и материалах конференций

4. Буцанец П.А., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г. (2012) Влияние салициловой кислоты на дыхание митохондрий, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы // В сб.: XXIV Зимняя молодежная научная школа, тезисы докладов и стендовых сообщений: «Перспективные направления физико-химической биологии» (Москва) С. 26.

5. Butsanets P.A., Baik A., Shugaeva N.A., Andreev I.M., Shugaev A.G. (2012) The effects of salicylic acid on respiratory activity of sugar beet taproot mitochondria // Plant Biology Congress (Freiburg, Germany) P. 763.

6. Буцанец П.А., Шугаев А.Г. (2012) Разобщающее и ингибирующее действие салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) // В сб.: Материалы докладов VIII международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва) С. 258.

- 7. Butsanets P.A., Shugaeva N.A., Andreev I.M., Shugaev A.G. (2012)** Uncoupling and inhibiting effects of salicylic acid on respiratory activity of sugar beet taproot mitochondria // Abstracts of 3rd International Symposium: "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design" (Lviv, Ukraine) P. 113.
- 8. Буцанец П.А. (2012)** Салициловая кислота регулирует активность альтернативного пути окисления в митохондриях люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) // В сб.: II(X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург) С. 58.
- 9. Буцанец П.А. (2013)** Салициловая кислота регулирует метаболическую активность митохондрий // В сб.: Материалы XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ- 2013» (Москва) С. 300.
- 10. Буцанец П.А., Шугаев А.Г. (2015)** Салициловая кислота изменяет проницаемость внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина // В сб.: Материалы IX Международного симпозиума "Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты" (Москва) С. 238-243.
- 11. Butsanets P., Shugaeva N., Shugaev A. (2017)** Effect of salicylic acid on respiratory activity and membrane potential generation in plant mitochondria // Norwegian journal of development of the international science №12 (part 1) P. 10-16.
- 12. Буцанец П.А., Шугаев А.Г. (2018)** Влияние салициловой кислоты на экспрессию генов альтернативной оксидазы в семядолях люпина // В сб.: «Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» Т. 2 С. 69-73.
- 13. Буцанец П.А., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г. (2018)** Влияние салициловой кислоты на образование перекиси водорода в митохондриях семядолей люпина // В сб.: «Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» Т. 2 С. 73-77.