

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1:577.23

**Н.С. Павловская, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова,
Н.А. Королёва, В.К. Войников**

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск)

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ДЫХАНИЯ И НАБУХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЗЛАКОВ К СОЕДИНЕНИЯМ, ИЗМЕНЯЮЩИМ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» (подпрограмма «Динамика генофондов»), грантов Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-4812.2006.4) и поддержки молодых российских ученых (МК-1876.2007.4), РФФИ (грант № 07-04-01055), Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 47, молодежного проекта СО РАН № 115 и Фонда содействия отечественной науке.

Изучено влияние ионов кальция, пальмитиновой кислоты, циклоспорина А, карбоксиатрактилозида, ГДФ и БСА на функционирование митохондрий злаков, различающихся по степени холодоустойчивости. Показано, что в митохондриях изученных злаков существует Ca^{2+} -зависимая и циклоспорин А-чувствительная пора. Установлено, что кратковременная и длительная холодовые обработки проростков озимой пшеницы приводят к снижению чувствительности процессов дыхания и набухания изолированных из них митохондрий к циклоспорину А, которая вновь проявляется после следующего за низкотемпературным окислительного воздействия, что позволяет предположить изменение свойств митохондриальной поры в условиях стресса. В набухании митохондрий озимой пшеницы как в нормальных, так и в стрессовых условиях принимает участие АДФ/АТФ-антипортер. Кратковременное холодовое воздействие приводит к повышению вклада в набухание митохондрий озимой пшеницы разобщающих белков, что обусловлено увеличением содержания в митохондриях СЖК. Установлено, что в митохондриях озимой пшеницы высокопроницаемая Ca^{2+} -зависимая и циклоспорин А-чувствительная пора является пальмитат-зависимой.

Ключевые слова: митохондрии; дыхание; набухание; разобщение окислительного фосфорилирования; высокопроницаемая митохондриальная пора.

В последнее время изменение проницаемости митохондриальных мембран привлекает большое внимание в связи с тем, что разобщение окислительного фосфорилирования и набухание матрикса митохондрий являются событиями, предшествующими открытию в митохондриях высокопроницаемой поры (от англ. permeability transition pore), высвобождению цитохрома *c* и инициации программированной клеточной гибели (ПКГ) [1, 2]. Вовлеченность митохон-

дрий в ПКГ как у животных, так и у растений не вызывает сомнений. Ведущую роль в изменении проницаемости митохондриальных мембран играют ионы Ca^{2+} , увеличение содержания которых в матриксе приводит к их взаимодействию со свободными жирными кислотами (СЖК) и индукции набухания органелл, открытию поры и индукции ПКГ [3, 4]. Способность жирных кислот вызывать открытие высокопроницаемой поры объясняется как их протонотропным действием [5, 6], так и непосредственным взаимодействием с АДФ/АТФ-антипортером [7]. Механизм индукции митохондриальной поры у растений изучен мало. Существование классической поры в растительных митохондриях, чувствительной к циклоспирину А (ЦА), до сих пор обсуждается, а данные о влиянии стрессовых факторов на процессы, происходящие при открытии высокопроницаемых пор у растений и приводящие к клеточной гибели, фрагментарны. В митохондриях растений обнаружены как чувствительные к ЦА высокопроницаемые поры [8, 9], так и нечувствительные [10–12].

Установлено, что окислительный стресс, вызванный обработкой H_2O_2 , является причиной выхода цитохрома *c* в цитозоль в клетках арабидопсиса [9]. ПКГ, индуцированная тепловым шоком, в растениях огурца [13] и аноксия озимой пшеницы [12] также приводят к высвобождению цитохрома *c* из митохондрий этих растений. Показано, что холодовой стресс служит стимулом для активации ПКГ в культуре клеток табака ВУ-2, который приводит к специфической фрагментации хроматина, сопряженной с апоптическими изменениями ядра и цитоплазмы [14]. В то же время отсутствуют данные о влиянии холодового воздействия на изменение проницаемости мембран митохондрий растений. Этиолированные проростки злаков представляют удобную модель для изучения изменения проницаемости митохондриальных мембран, поскольку колеоптиль и первый лист злаков в процессе онтогенеза претерпевает ПКГ [15].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния соединений, изменяющих проницаемость митохондриальных мембран, на функционирование митохондрий злаков, различающихся по степени холодоустойчивости.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 3-дневные этиолированные побеги проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская озимая), озимой ржи (*Secale cereale* L., сорт Чулпан), кукурузы (*Zea mays* L., сорт Российская 1), выращенные на влажной фильтровальной бумаге при 26°C. Всхожесть семян составляла 92–95,0%.

Растительный материал подвергали кратковременной холодовой обработке (–4°C, 1 ч), холодовому закаливанию (4°C, 7 сут), окислительному стрессу (0,5 мМ H_2O_2 , 4 ч), а также сочетанию кратковременной холодовой обработки с последующим окислительным стрессом и холодового закаливания с последующим окислительным стрессом.

Митохондрии выделяли с помощью дифференциального центрифугирования [16]. Очистку органелл проводили модифицированным методом в ступенчатом градиенте перколла, состоящем из 18, 23, 35% перколла [17]. Цело-

стность наружной мембраны очищенных митохондрий определяли по активности цитохром *c* оксидазы (ЕС 1.9.3.1) [18] в отсутствии и присутствии 0,04% Тритона X-100.

Активность митохондрий регистрировали полярографически с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) в ячейке объемом 1,4 мл [19] на полярографе ОН-105 (Венгрия) при температуре 26–27°C. Реакционная среда для определения активности митохондрий содержала 18 мМ KH_2PO_4 (рН 7,4), 125 мМ KCl , 1 мМ MgCl_2 в присутствии 5 мМ ЭДТА или в его отсутствии. Использовали следующие субстраты окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат и 1 мМ НАДН.

Полярограммы были использованы для расчёта скоростей фосфорилирующего (состояние 3, V3) и нефосфорилирующего (состояние 4, V4) дыхания, коэффициента дыхательного контроля по Чансу–Вильямсу и отношения АДФ:О [20]. Скорости дыхания в состояниях 3 и 4 выражали в нмоль O_2 /(мин·мг митохондриального белка). Концентрацию митохондриального белка определяли в соответствии с методом Lowry с соавт. [21].

Набухание выделенных митохондрий измеряли спектрофотометрически при длине волны 540 нм на приборе СФ-26 (Россия). Измерение проводили в аэрируемой среде в кюветах объемом 2 мл при температуре 26°C. Среда для набухания содержала 200 мМ KCl и 20 мМ MOPS (рН 7,4). О набухании судили по падению оптической плотности митохондриальной суспензии (ОП_{540}), данные рассчитывали в виде разницы оптической плотности ($\Delta\text{ОП}_{540}$), равной $(\text{ОП}_{t_0} - \text{ОП}_{t_1}) \cdot 100$, где ОП_{t_0} – начальная оптическая плотность, ОП_{t_1} – оптическая плотность через определенное время.

В качестве индукторов митохондриальной поры применяли ионы Ca^{2+} (в составе CaCl_2) (1,75 мМ) и пальмитиновую кислоту (50 мкМ). В качестве соединений, изменяющих проницаемость митохондриальных мембран, использовали ЦА (1 мкМ) – специфичный ингибитор митохондриальной поры, карбоксиатрактилозид (КАТ) (1 мкМ) – ингибитор АДФ/АТФ-антипортера, ГДФ (1 мМ) – ингибитор растительного разобщающего белка РUMP и 0,5%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА), связывающий СЖК. Инкубацию с ионами Ca^{2+} и ЦА проводили при температуре 0°C в течение 5 мин.

Электрофорез белков в ПААГе с ДДС-Na проводили в блоках полиакриламидного геля в модифицированной системе Лэммли [22], используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Sigma», США) проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Определение молекулярных масс полипептидов проводили, используя в качестве стандартов набор белков («Sigma», США).

Все опыты проведены в 3–6 биологических повторностях. На рис. 1–7 указаны средние значения и их стандартные отклонения.

Результаты исследования

ЭДТА является одним из постоянных компонентов среды выделения митохондрий. Он выполняет защитную функцию, т.к. является комплексообраз-

зователем, связывающим ионы Ca^{2+} , которые освобождаются при разрушении ткани. Для изучения влияния ионов Ca^{2+} и ЦА на скорость нефосфорилирующего дыхания митохондрий разных видов растений, отличающихся по степени холодоустойчивости (озимая рожь, озимая пшеница и кукуруза), необходимо было проверить, как влияет исключение ЭДТА из сред промывания, ресуспендирования и инкубации на чувствительность митохондрий к указанным реагентам.

О влиянии индукторов и ингибиторов митохондриальной поры на функционирование митохондрий озимой пшеницы судили по их действию на скорость нефосфорилирующего дыхания (состояние 4, V4). Это связано с тем, что в основе механизма разобщения окислительного фосфорилирования лежит рост скорости дыхания в присутствии субстратов и в отсутствии АДФ [23].

Митохондрии злаков, изолированные и инкубируемые в средах, содержащих ЭДТА, были нечувствительны к действию ЦА (рис. 1). Это позволяет предположить, что на всех уровнях изоляции митохондрий происходит связывание ионов Ca^{2+} , что является причиной отсутствия существенного влияния ЦА на скорость нефосфорилирующего дыхания.

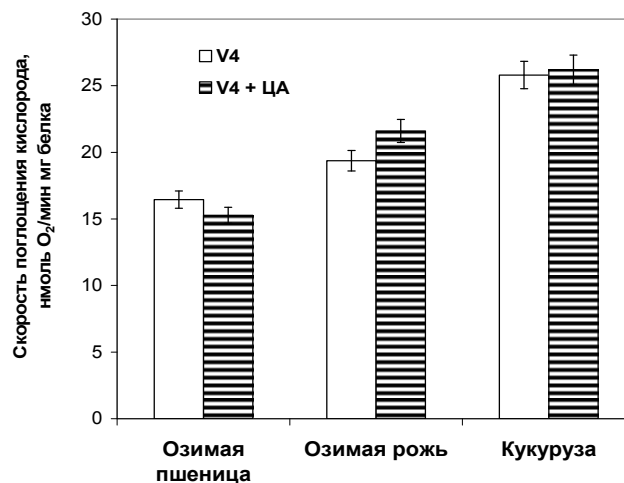


Рис. 1. Влияние циклоспорина А (ЦА) на скорость нефосфорилирующего дыхания (V4) митохондрий озимой пшеницы, озимой ржи и кукурузы, выделенных в средах, содержащих ЭДТА, и инкубируемых в среде с ЭДТА. Субстрат окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат. Концентрация циклоспорина А (ЦА) равна 1 мкМ, ионов Ca^{2+} – 1,75 мМ и ЭДТА – 5 мМ. $M \pm S.D.$, $n = 3-6$

В то же время ЦА ингибировал нефосфорилирующее дыхание митохондрий, изолированных в средах с добавлением ЭДТА, но инкубируемых в его отсутствие (рис. 2). Присутствие в инкубационной среде ионов Ca^{2+} приводило к увеличению скорости нефосфорилирующего дыхания при окислении митохондриями малата и НАДН, т.е. ионы Ca^{2+} в этих условиях являлись разобщающими агентами (рис. 2). Эта чувствительность была наибольшей в

митохондриях озимой пшеницы и кукурузы (рис. 2). Ca^{2+} -вызванная стимуляция скорости нефосфорилирующего дыхания ингибировалась добавлением ЦА при окислении малата и НАДН (рис. 2).

В митохондриях, выделенных и инкубируемых в средах, не содержащих ЭДТА, происходило увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания в присутствии ионов Ca^{2+} при окислении всех используемых субстратов дыхания, которое было ЦА-чувствительно (рис. 3).

Таким образом, действие специфичного ингибитора митохондриальной поры – ЦА – и ионов Ca^{2+} – индукторов поры – наблюдали у митохондрий всех изученных злаков как выделенных и инкубируемых в отсутствие ЭДТА, так и у митохондрий, только инкубируемых без ЭДТА. Полученные в работе данные позволяют говорить о существовании в митохондриях из этиолированных проростков озимой пшеницы, озимой ржи и кукурузы регулируемой Ca^{2+} -зависимой и ЦА-чувствительной поры.

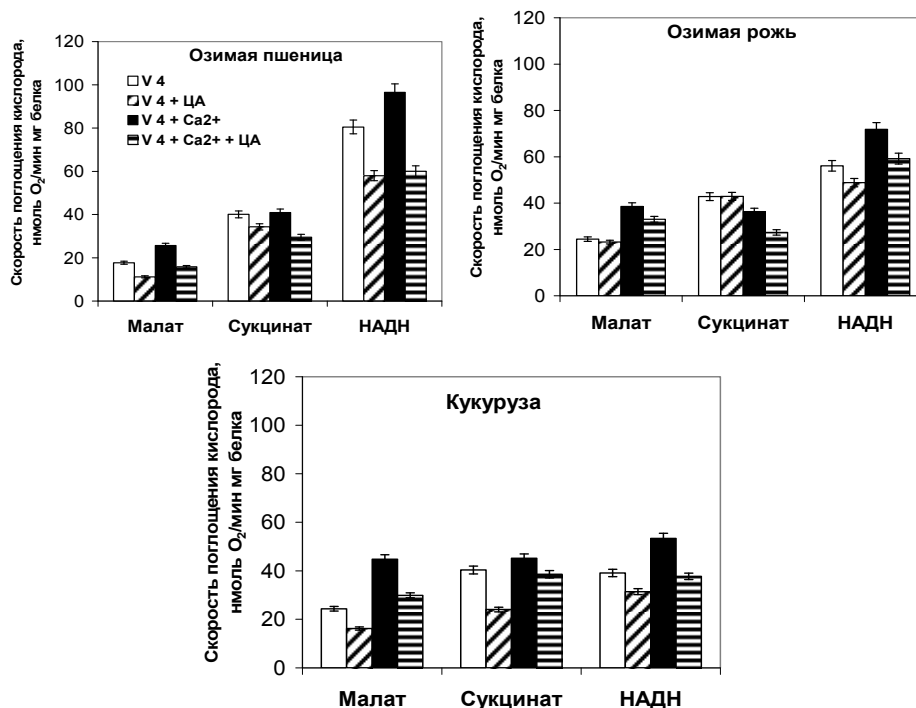


Рис. 2. Влияние циклоспорина А (ЦА) на скорость нефосфорилирующего дыхания (V4) митохондрий озимой пшеницы, озимой ржи и кукурузы, выделенных в средах, содержащих ЭДТА, и инкубируемых в отсутствие и присутствии ионов Ca^{2+} в среде без ЭДТА. Субстраты окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат и 1 мМ НАДН. Концентрация циклоспорина А (ЦА) равна 1 мкМ, ионов Ca^{2+} – 1,75 мМ и ЭДТА – 5 мМ. $M \pm S.D.$, $n = 3-6$

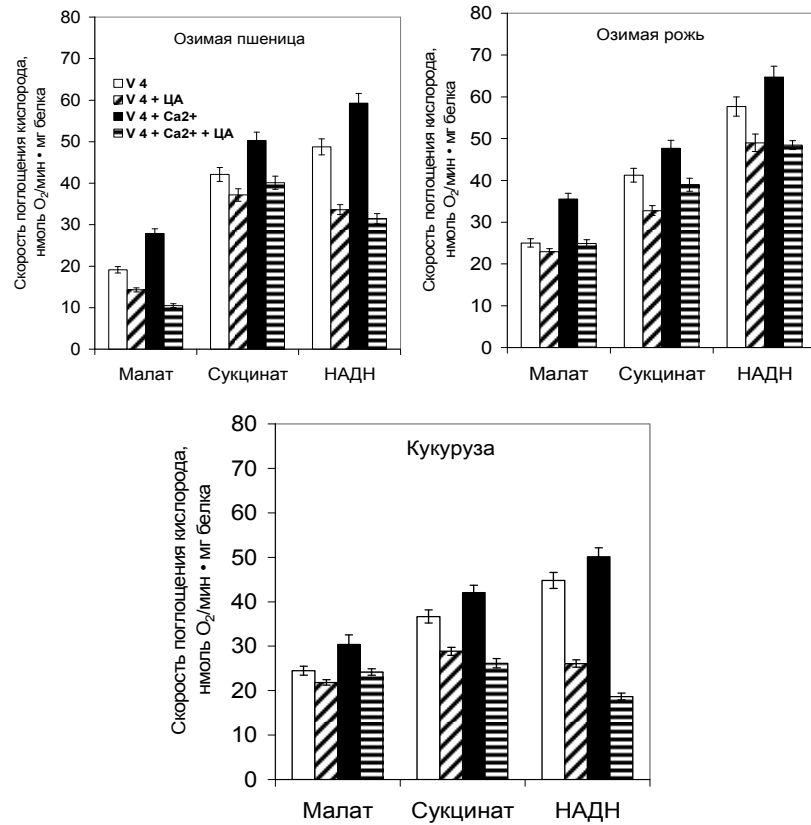


Рис. 3. Влияние циклоспорина А (ЦА) на скорость нефосфорилирующего дыхания (V4) митохондрий озимой пшеницы, озимой ржи и кукурузы, выделенных в средах, не содержащих ЭДТА, и инкубируемых в отсутствии и присутствии ионов Ca²⁺ в среде без ЭДТА. Субстраты окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат и 1 мМ НАДН. Концентрация циклоспорина А (ЦА) равна 1 мкМ, ионов Ca²⁺ – 1,75 мМ. M±S.D., n = 3–6

Этиолированные проростки злаков являются удобной моделью для изучения механизмов ПКГ стареющего органа у растений. Показано, что в колеоптиле этиолированных проростков озимой пшеницы апоптоз происходит на 6–8-й день [15], а в первом листе – на 5–8-й день [24]. Поскольку процесс клеточной гибели является генетически запрограммированным, то интересно было изучить изменение проницаемости митохондриальных мембран в присутствии индукторов и ингибиторов высокопроницаемой поры на более ранних этапах развития проростков озимой пшеницы (в возрасте 3 дней).

Изучение интактности наружной мембраны митохондрий, изолированных из проростков, не подвергнутых действию стрессовых факторов, и из проростков, подвергнутых низкотемпературному и окислительному воздействиям, показало ее высокие значения (от 94–99,0%). На хорошую сохранность изолированных митохондрий также указывают данные иммуноблоттинга мито-

хондриальных белков с антителами к цитохрому *c*. Во всех препаратах митохондрий обнаружено присутствие белка с мол. массой около 18 кД, в то время как в цитоплазматической фракции цитохрома *c* не обнаружено (рис. 4).

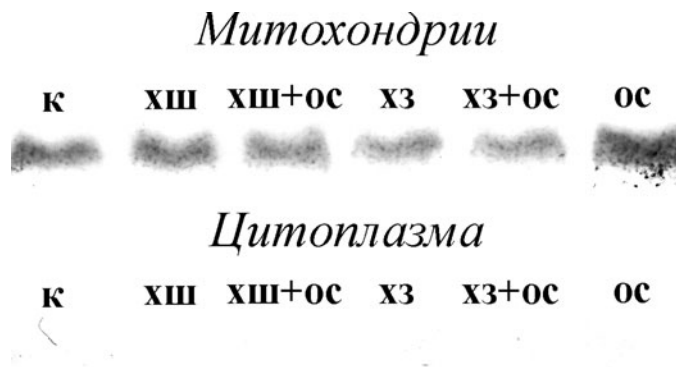


Рис. 4. Иммуноблоттинг с поликлональными антителами на цитохром *c* митохондриальных белков из проростков озимой пшеницы, подвергнутых стрессовым воздействиям. Электрофорез проводили в 15%-ном ПААГе с ДДС-Na. Обозначения: К – контроль, ХШ – кратковременное холодное воздействие (-4°C , 1 ч), ХШ+ОС – ХШ с последующим окислительным стрессом (0,5 мМ H_2O_2 , 4 ч), ХЗ – холодное закаливание (4°C , 7 сут), ХЗ+ОС – ХЗ с последующим окислительным стрессом, ОС – окислительный стресс (0,5 мМ H_2O_2 , 4 ч)

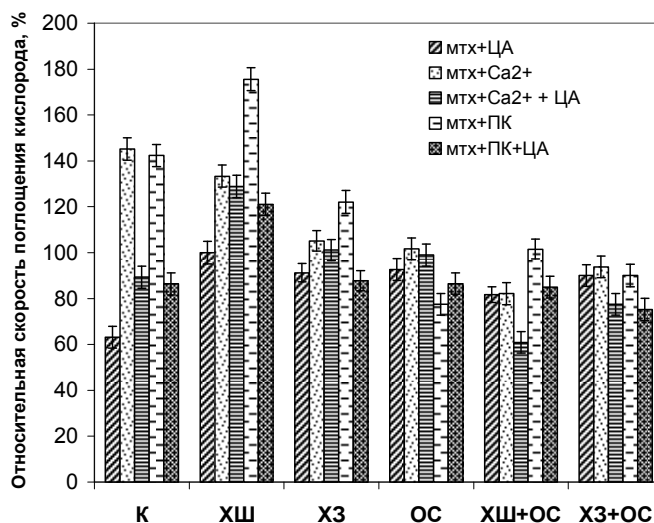


Рис. 5. Влияние ионов Ca^{2+} , пальмитиновой кислоты (ПК) и циклоспорина А (ЦА) на нефосфорилирующее дыхание (V_4) митохондрий озимой пшеницы из контрольных проростков и проростков, подвергнутых стрессовым воздействиям. Субстрат окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат. За 100% принята скорость дыхания митохондрий в нефосфорилирующем состоянии в отсутствии ЦА, ионов Ca^{2+} и ПК. Концентрация циклоспорина А (ЦА) равна 1 мкМ, ионов Ca^{2+} – 1,75 мМ и пальмитиновой кислоты (ПК) – 50 мкМ. $M \pm S.D.$, $n = 3-6$. Обозначения см. на рис. 4

Дыхание митохондрий из контрольных проростков озимой пшеницы оказалось чувствительным к индукторам (ионы Ca^{2+} и пальмитиновая кислота) и ингибитору (ЦА) митохондриальной поры (рис. 5), что позволило предположить функционирование Ca^{2+} /пальмитат-зависимой и ЦА-чувствительной поры в митохондриях этих проростков.

В то же время кратковременное и длительное холодовые воздействия на проростки озимой пшеницы изменяли чувствительность выделенных из них митохондрий к ЦА (рис. 5). Присутствие в инкубационной среде митохондрий ионов Ca^{2+} приводило к увеличению скорости нефосфорилирующего дыхания (рис. 5). Однако наблюдаемое увеличение не ингибировалось ЦА (рис. 5). Пальмитиновая кислота вызывала стимуляцию скорости нефосфорилирующего дыхания, которое было ЦА-чувствительно (рис. 5). Следующий за низкотемпературным окислительный стресс, вызываемый обработкой проростков озимой пшеницы перекисью водорода, приводил к появлению чувствительности дыхания митохондрий к ЦА (рис. 5).

В экспериментах с инкубацией контрольных митохондрий озимой пшеницы с ЦА обнаружили снижение набухания органелл (рис. 6). Так как известно, что накопление ионов Ca^{2+} в митохондриях вызывает открытие высокопроницаемых пор [10, 12, 25], было изучено влияние ионов Ca^{2+} на набухание митохондрий озимой пшеницы, которые предварительно инкубировались с ЦА и без него. Присутствие ионов Ca^{2+} в инкубационной среде стимулировало степень набухания митохондрий (рис. 6). Ca^{2+} -индуцированное набухание ингибировалось после предварительной инкубации митохондрий с ЦА (рис. 6). Увеличение степени набухания контрольных митохондрий наблюдали и в присутствии пальмитиновой кислоты, действие которой было аналогичным действию ионов Ca^{2+} (рис. 6). Вызванное пальмитиновой кислотой набухание было чувствительным к ЦА (рис. 6).

При добавлении к митохондриям КАТ – ингибитора АДФ/АТФ-антипортера – наблюдали снижение набухания (рис. 7), что свидетельствует о том, что в набухании митохондрий озимой пшеницы принимает участие АДФ/АТФ-антипортер. При добавлении БСА, связывающего СЖК, происходило также уменьшение степени набухания митохондрий (рис. 7). В то время как ГДФ – ингибитор растительного разобщающего белка РУМР – не оказывал влияния на набухание митохондрий озимой пшеницы (рис. 7).

ЦА-чувствительная, Ca^{2+} - и пальмитат-зависимая стимуляция набухания митохондрий озимой пшеницы согласуется с данными, полученными при изучении влияния ЦА, ионов Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты на дыхание митохондрий озимой пшеницы, которые также выявили ЦА-чувствительный, Ca^{2+} - и пальмитат-зависимый характер разобщения процессов окисления и фосфорилирования митохондрий. Поскольку набухание митохондрий является одним из показателей открытия высокопроницаемой митохондриальной поры, можно заключить, что наблюдаемое разобщение окислительного фосфорилирования и набухание митохондрий связаны с открытием митохондриальной поры.

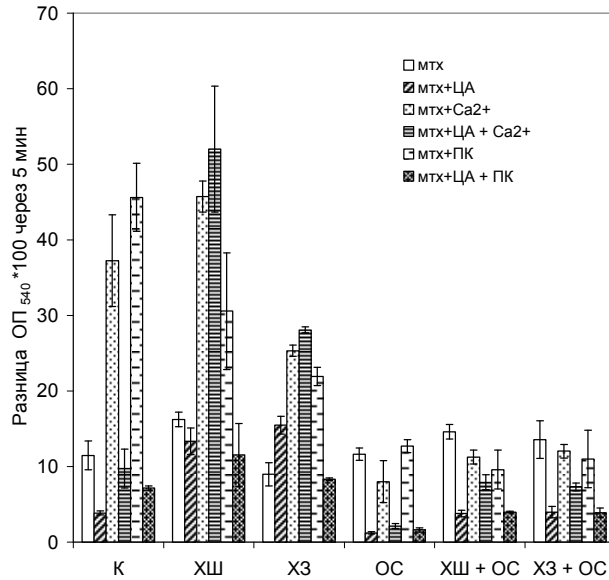


Рис. 6. Чувствительность набухания митохондрий озимой пшеницы из контрольных проростков и проростков, подвергнутых стрессовым воздействиям, к индукторам (ионы Ca²⁺ и пальмитиновая кислота) и ингибитору (циклоспорин А) митохондриальной поры. Концентрация циклоспорина А (ЦА) равнялась 1 мкМ, ионов Ca²⁺ – 1,75 мМ и пальмитиновой кислоты (ПК) – 50 мкМ. М±S.D., n = 3–6. Обозначения см. на рис. 4

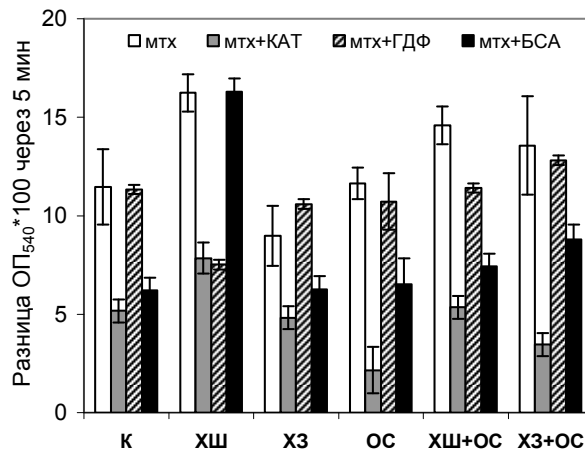


Рис. 7. Чувствительность набухания митохондрий озимой пшеницы из проростков, подвергнутых стрессовым воздействиям, к карбоксиатрактилозиду (КАТ), ГДФ и бычьему сывороточному альбумину (БСА). Концентрация ингибиторов составляла: 1 мкМ КАТ, 1 мМ ГДФ и 0,5% БСА. М±S.D., n = 3–6. Обозначения см. на рис. 4

Набухание митохондрий из проростков, подвергнутых кратковременному и длительному низкотемпературным воздействиям, было нечувствительно к действию ЦА (см. рис. 6). Инкубация этих митохондрий с ионами Ca^{2+} стимулировала набухание, которое было также ЦА-нечувствительно (см. рис. 6). Индукция набухания митохондрий в присутствии пальмитиновой кислоты была менее выражена, по сравнению с эффектом этой кислоты в митохондриях, изолированных из контрольных проростков. Набухание митохондрий, вызванное действием пальмитиновой кислоты, полностью ингибировалось ЦА (см. рис. 6). При добавлении КАТ и ГДФ к митохондриям, изолированным из проростков, подвергнутых кратковременному холодовому воздействию, происходило снижение набухания (см. рис. 7). Добавление БСА к митохондриям не изменяло степень их набухания (см. рис. 7). Снижение степени набухания митохондрий под действием ингибиторов АДФ/АТФ-антипортера и разобщающего белка РУМР указывает на вклад этих белков в ответ на кратковременное холодовое воздействие. Если в митохондриях контрольных проростков действие ГДФ на набухание отсутствовало, то его влияние на набухание митохондрий из проростков, подвергнутых холодовому стрессу, указывает на важную роль разобщающего белка РУМР в условиях стресса. Отсутствие влияния БСА на набухание митохондрий объясняется увеличением во время холодового стресса содержания СЖК и тем, что используемой концентрации БСА оказывается недостаточно для их связывания.

Действие КАТ в митохондриях из закаленных в холоде проростков было аналогичным его эффекту в митохондриях из проростков, подвергнутых кратковременному холодовому воздействию (см. рис. 7). Добавление ГДФ к митохондриям закаленных проростков не изменяло степень их набухания, тогда как БСА снижал степень набухания митохондрий из закаленных проростков (см. рис. 7). Эти данные указывают на то, что при холодовом закаливании в набухании митохондрий озимой пшеницы, обусловленном действием СЖК, принимает участие АДФ/АТФ-антипортер.

Набухание митохондрий из проростков, подвергнутых окислительному стрессу как самому по себе, так и после действия низких температур, так же как и набухание митохондрий из контрольных проростков, ингибировалось ЦА. Присутствие ионов Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты не вызывало стимуляции набухания митохондрий. КАТ и БСА вызывали снижение степени набухания, в то время как ГДФ не оказывал влияния (см. рис. 7). Снижение набухания под действием КАТ наряду с действием БСА в митохондриях озимой пшеницы из проростков, подвергнутых действию окислительного стресса, указывает на роль АДФ/АТФ-антипортера в набухании, обусловленном СЖК.

Обсуждение результатов исследования

Митохондрии, являясь одним из центров регуляции энергетического метаболизма, играют ключевую роль в ответе растений на стрессовые воздействия, а также выступают в качестве центральных органелл в процессе ПКГ. Известно, что высокие и низкие температуры и окислительный стресс вызывают изменение проницаемости митохондриальных мембран у животных,

связанной с разобщением окислительного фосфорилирования и набухания матрикса митохондрий [26]. Увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны за счет разобщения окислительного фосфорилирования и набухания предшествует открытию в митохондриях высокопроницаемой поры, выходу апоптогенных белков и инициации ПКГ [2]. В этих событиях важная роль принадлежит ионам Ca^{2+} и СЖК. Способность СЖК вызывать открытие высокопроницаемой поры объясняется их протонофорным действием [5–6] и взаимодействием с АДФ/АТФ-антипортером [7], а также образованием комплекса жирной кислоты и ионов Ca^{2+} [4].

Проблема регуляции высокопроницаемой митохондриальной поры находится в центре научного внимания. Существование классической ЦА-чувствительной поры в растительных митохондриях до сих пор обсуждается, а данные о влиянии стрессовых факторов на процессы, происходящие при открытии высокопроницаемых пор у растений, малочисленны. Полагают, что высокопроницаемые поры имеют два функциональных состояния: регулируемое состояние, которое активируется ионами Ca^{2+} и ингибируется специфическим ингибитором – ЦА и ионами Mg^{2+} , и нерегулируемое состояние, которое является Ca^{2+} -независимым и нечувствительным к ЦА и ионам Mg^{2+} [27].

Этиолированные проростки злаков являются удобной моделью для изучения механизмов старения и естественной, неиндуцированной внешними воздействиями запрограммированной гибели клеток стареющего органа у растений [15]. С использованием в качестве маркеров апоптоза фрагментации ядерной ДНК и изменений на уровне ультраструктурной организации клеток показано, что в колеоптиле этиолированных проростков пшеницы апоптоз происходит на 6–8-й день [15], а в первом листе – на 5–8-й день [24]. В нашей работе было изучено изменение проницаемости митохондриальных мембран злаков в присутствии индукторов и ингибиторов высокопроницаемой поры у этиолированных проростков в возрасте 3 дней.

Изучение влияния ионов Ca^{2+} , как индукторов, и ЦА, как ингибитора митохондриальной поры, эффект которого выступает диагностическим признаком классической высокопроницаемой поры, на функционирование митохондрий злаков, различающихся по степени холодоустойчивости (озимая рожь, озимая пшеница и кукуруза), позволило установить, что в митохондриях всех изученных растений существует Ca^{2+} -зависимая и ЦА-чувствительная пора. Однако действие ионов Ca^{2+} и ЦА на дыхание митохондрий проростков озимой пшеницы, по сравнению с митохондриями проростков озимой ржи, было более выражено.

На митохондриях животных показана роль пальмитиновой кислоты в апоптозе, связанном с открытием Ca^{2+} /пальмитат-зависимой поры, нечувствительной к ЦА [4]. Использование в наших экспериментах пальмитиновой кислоты выявило ЦА-чувствительную, Ca^{2+} - и пальмитат-зависимую стимуляцию скорости нефосфорилирующего дыхания митохондрий озимой пшеницы. Эти данные согласуются с результатами, полученными при изучении влияния ЦА, ионов Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты на набухание митохондрий озимой пшеницы, которые также имели ЦА-чувствительный, Ca^{2+} - и пальмитат-зависимый характер. В связи с этим можно сделать вывод, что в митохондриях озимой пшеницы существует Ca^{2+} /пальмитат-зависимая и ЦА-

чувствительная пора. Однако способность ЦА ингибировать процессы дыхания и набухания митохондрий исчезала после низкотемпературного воздействия на проростки и появлялась после следующего за низкотемпературным окислительного стресса, что позволяет заключить, что в условиях стресса происходят изменения свойств митохондриальной поры.

Следует заметить, что в отличие от обнаруженной нами чувствительности набухания митохондрий из побегов проростков озимой пшеницы к ЦА Vigna-lainen с соавт. [12] на митохондриях из корней проростков озимой пшеницы показали нечувствительность набухания к данному ингибитору. Можно предполагать, что механизмы индукции и регуляции открытия высокопроницаемой поры в митохондриях зависят даже от функциональной роли того или иного органа растения. Полученные нами данные согласуются с предположением других авторов о нескольких функциональных состояниях высокопроницаемой поры как в митохондриях животных, так и растений [8–12, 27] и указывают на то, что индукция и регуляция митохондриальной поры могут происходить посредством нескольких механизмов.

Известно, что одним из структурных компонентов митохондриальной поры является АДФ/АТФ-антипортер [1–2]. Ингибиторный анализ выявил участие АДФ/АТФ-антипортера при набухании митохондрий озимой пшеницы, изолированных как из контрольных проростков, так и после изученных стрессовых воздействий. Оказалось, что в набухании митохондрий из проростков озимой пшеницы, подвергнутых кратковременному холодовому воздействию, наряду с АДФ/АТФ-антипортером принимает участие разобщающий белок PUMP [28].

Обнаружение в митохондриях знаков Ca^{2+} -зависимой и ЦА-чувствительной поры и изменения ее свойств при холодном и окислительном воздействиях значительно расширяет и дополняет имеющиеся знания о процессах, предшествующих инициации программы клеточной гибели в растительной клетке, и открывает перспективы для дальнейших исследований в области изучения ПКГ растений.

Литература

1. Crompton M. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Role in Cell Death // *Biochem. J.* 1999. Vol. 341. P. 233–249.
2. Tsujimoto Y., Shimizu S. Role of the Mitochondrial Membrane Permeability Transition in Cell Death // *Apoptosis*. 2007. Vol. 12, № 5. P. 835–840.
3. Di Paola M., Lorusso M. Interaction of Free Fatty Acids with Mitochondria: Coupling, Uncoupling and Permeability Transition // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1757. P. 1330–1337.
4. Belosludtsev K.N., Saris N.E., Andersson L.C., Belosludtseva N., Agafonov A., Sharma A., Moshkov D.A., Mironova G.D. On the Mechanism of Palmitic Acid-Induced Apoptosis: the Role of a Pore Induced by Palmitic Acid and Ca^{2+} in Mitochondria // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2006. Vol. 38, № 2. P. 113–120.
5. Skulachev V.P. Uncoupling: New Approaches to an Old Problem of Bioenergetics // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. Vol. 1363. P. 100–124.
6. Wojtczak L., Schonfeld P. Effect of Fatty Acid on Energy Coupling Processes in Mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. Vol. 1183. P. 41–57.

7. Skulachev V.P. Fatty Acid Circuit as a Physiological Mechanism of Uncoupling of Oxidative Phosphorylation // FEBS Lett. 1991. Vol. 294. P. 158–162.
8. Arpagaus S., Rawlyer A., Braendle R. Occurrence and Characteristics of the Mitochondrial Permeability Transition in Plants // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 3. P. 1780–1787.
9. Tiwari B.S., Belenghi B., Levine A. Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death // Plant Physiol. 2002. Vol. 103. P. 845–854.
10. Fortes F., Castilho R.F., Catisti R., Carnieri E.G.S., Vercesi A.E. Ca²⁺ Induces a Cyclosporin A–Insensitive Permeability Transition Pore in Isolated Potato Tuber Mitochondria Mediated by Reactive Oxygen Species // J. Bioenerg. Biomembr. 2001. Vol. 33, № 1. P. 43–51.
11. Curtis M.J., Wolpert T.J. The Oat Mitochondrial Permeability Transition and Its Implication in Victorin Binding and Induced Cell Death // Plant J. 2002. Vol. 29, № 3. P. 295–312.
12. Virolainen E., Blokhina O., Fagerstedt K. Ca²⁺-Induced High Amplitude Swelling and Cytochrome c Release from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Mitochondria under Anoxic Stress // Ann. Bot. 2002. Vol. 90. P. 509–516.
13. Balk J., Leaver C.J., McCabe P.F. Translocation of Cytochrome c from the Mitochondria to the Cytosol Occurs during Heat–Induced Programmed Cell Death in Cucumber Plants // FEBS Lett. 1999. Vol. 463. P. 151–154.
14. Koukalova B., Kovarik A., Fajkus J., Siroky J. Chromatin Fragmentation Associated with Apoptotic Changes in Tobacco Cells Exposed to Cold Stress // FEBS Lett. 1997. Vol. 414. P. 289–292.
15. Курнос М.Д., Александрушкина Н.И., Шорнинг Б.Ю., Кудряшова И.Б., Ванюшин Б.Ф. Межнуклеосомная фрагментация и синтез ДНК в проростках пшеницы // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 48–57.
16. Войников В.К. К вопросу о выделении интактных растительных митохондрий // Известия Сибирского отделения АН СССР. Сер. биол. наук. 1980. Т. 10, вып. 2. С. 121–125.
17. Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Колесниченко А.В., Сумина О.Н., Войников В.К. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 238–244.
18. Tolbert N.E. Isolation of Sub-Cellular Organelles of Metabolism on Isopicnic Sucrose Gradients // Methods Enzymol. 1974. Vol. 31. P. 734–746.
19. 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.
20. Estabrook R.W. Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP:O Ratio // Methods Enzymol. 1967. Vol. 10. P. 41–47.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
22. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assemble of the Head Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
23. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 564 с.
24. Замятнина В.А., Бакеева Л.Е., Александрушкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз в первом листе у этилированных проростков пшеницы: влияние антиоксиданта ионола (ВНТ) и перекисей // Биохимия. 2002. Т. 67, вып. 2. С. 253–264.
25. Hansson M.J., Persson T., Friberg H., Keep M.F., Rees A., Wieloch T., Elmer E. Powerful Cyclosporin Inhibition of Calcium-Induced Permeability Transition in Brain Mitochondria // Brain Research. 2003. Vol. 960. P. 99–111.
26. Kaasik A., Saifulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of Mitochondrial Matrix Volume // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007. Vol. 292. P. 157–163.
27. He L., Lemasters J.J. Regulated and Unregulated Mitochondrial Permeability Transition Pores: a New Paradigm of Pore Structure and Function // FEBS Lett. 2002. Vol. 512. P. 1–7.

28. Murayama S., Handa H. Isolation and Characterization of cDNAs Encoding Mitochondrial Uncoupling Proteins in Wheat: Wheat UCP-genes are not Regulated by Low Temperature // Mol. Gen. Genet. 2000. Vol. 264. P. 112–118.

Поступила в редакцию 15.01.2010 г.

**Natalie S. Pavlovskaya, Olga I. Grabelnych, Tamara P. Pobezhimova,
Nina A. Koroleva, Viktor K. Voinikov**

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

**SENSITIVITY OF RESPIRATION AND SWELLING OF CEREALS MITOCHONDRIA
TO MODIFYING PERMEABILITY OF MITOCHONDRIAL
MEMBRANES COMPOUNDS**

The aim of the given investigation was to study the influence of compounds modifying permeability of mitochondrial membranes on the functioning of cereals mitochondria differing in the extent of cold resistance. It is shown that Ca^{2+} -dependent and CsA-sensitive pore exist in mitochondria of studied cereals. It is determined that short-term and long cold treatments of winter wheat seedlings lead to a decrease in sensitivity of respiration and swelling of isolated mitochondria to CsA that shows again after oxidative stress following cold stress. This fact allows supposing the change of mitochondrial pore properties under stress conditions. ADP/ATP antiporter takes part in swelling mitochondria from winter wheat both in normal and in stress conditions. The short-term cold treatment leads to an increase in contribution of uncoupling proteins to swelling mitochondria from winter wheat that is caused by increasing content of FFA in mitochondria. It is determined that in winter wheat mitochondria Ca^{2+} -dependent and CsA-sensitive pore is palmitate-dependent.

Key words: mitochondria; respiration; swelling; uncoupling of oxidative phosphorylation; permeability transition pore.

Received January 15, 2010