

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В МИТОХОНДРИЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *IN ORGANELLO* И *IN VIVO*: ЭФФЕКТЫ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ

Абдрахимова Й.Р.^{1,2}, Абдрахимов Ф.А.³, Андреев И.М.¹, Шугаев А.Г.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая 35, г. Москва, 127276, Россия

²ФГОАУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, Россия, E-mail: yoldez@mail.ru

³ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия

Triticum aestivum, проростки, митохондрии, *in organello* и *in vivo*, активные формы кислорода, аламетицин, флуоресцентные красители, холоддовая акклимация

Введение

Не снижающийся в течение последних десятилетий научный интерес к проблемам образования активных форм кислорода (АФК) и механизмам регуляции их метаболизма обусловлен множественной ролью, которая отводится им в разных аспектах жизнедеятельности клеток, от деления до смерти. Одними из обсуждаемых в биологии и биомедицине остаются вопросы, связанные с двойственной природой АФК, генерируемых клетками при различных видах стрессов [1,2]. С одной стороны, это может быть следствием нарушений редокс-баланса клеток и развития патологических состояний, с другой,- запуска АФК-опосредованных сигнальных путей, в том числе от митохондрий [1]. Благодаря влиянию на экспрессию генома, последнее обстоятельство приобретает важное значение для координации адаптивных метаболических процессов, учитывая постоянно меняющиеся внешние и внутренние условия [1]. Такого типа исследования требуют относительно быстрого и высокоспецифичного количественного определения скорости генерации АФК, особенно учитывая низкие внутриклеточные концентрации, транзитный характер их изменений и относительно короткий период жизни, а также хорошо эшелонированную систему антиоксидантной защиты как отдельных органоидов, так и клеток в целом, особенно растительных. В связи с этим до сих пор актуальной остается проблема поиска и оптимизации методических подходов оценки генерации АФК, которые в настоящее время в подавляющем большинстве проводятся с использованием флуоресцентных индикаторов, имеющих ряд преимуществ и недостатков [2]. Целью наших исследований было выявление холодиндуцированных изменений в образовании пероксида водорода митохондриями проростков озимой пшеницы в условиях *in vitro* и *in vivo* с помощью оптимизированных нами методических подходов применения флуоресцентных красителей.

Материалы и методы

Этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., с.Мироновская 808) выращивали гидропонным способом при 23-24°C в течение 3 сут. (контроль), часть из которых подвергали холоддовому воздействию при 3-4°C в течение 6 сут. (опыт). Семена сортовой элиты были любезно предоставлены акад. И.Б.Сандухадзе (МосНИИСХ). Выделение митохондрий и контроль их функциональной активности, в том числе определение генерации трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), проводили как описано в [3]. Реал-тайм регистрацию образования H_2O_2 выделенными митохондриями проводили, используя Amplex Red (AR, Molecular Probes®) [4]. Интенсивность генерации АФК в интактных клетках эпидермиса колеоптилей определяли с помощью 2,7-дихлордигидро-флуоресцеиндиацетата (H2DCF-DA) на лазерном конфокальном микроскопе LSM510 META (Carl Zeiss). Для выявления колокализации изучаемых процессов с митохондриями использовали высокоспецифичный катионный флуоресцентный краситель тетраметилродамин (TMRM), накапливающийся в митохондриях пропорционально их $\Delta\psi_m$.

Результаты и обсуждение

Было показано, что скорость образования H_2O_2 (ВАФК) выделенными митохондриями при окислении ими 5мМ малата (с глутаматом) составляла 110-120 пикомоль/мин/мг белка в контроле и повышалась после 6 сут. гипотермии до 180-190 пикомоль (рис.1). Переход митохондрий из состояния 3 в состояние 4 (после истощения АДФ) сопровождался усилением генерации H_2O_2 , которое было более выражено в контроле - на 70% напротив 30% в опыте, что способствовало снижению исходной разницы в ВАФК (рис.1). Вызванные гипотермией изменения ВАФК скорее всего были обусловлены уменьшением торможения электронного потока по ЭТЦ дыхания при переходе в состояние 4 и, как следствие, «сверхвосстановленности» ее компонентов, что, как правило, связывают с активацией целого ряда энерго-диссипирующих систем. Вместе с тем потенциальная ВАФК у митохондрий из закаленных проростков была почти вдвое выше по сравнению с таковой контроля, что было выявлено нами с помощью антибиотика аламетицина, который пермеабилзирует митохондрии, т.е. делает их мембраны проницаемыми для небольших молекул, в том числе АФК, без нарушения тонкой внутренней организации органелл [5]. Так, добавка 25 мкг/мл аламетицина к митохондриям позволила выявить «прибавку» в ВАФК в среднем на 50% и 120% в контроле и опыте, соответственно (рис.1). Причиной такой разницы может служить усиление гипотермией функционирования тех систем ЭТЦ митохондрий, которые «экскретируют» АФК в их внутренний компартмент, в первую очередь, комплекса I [5]. Холод-индуцированное возрастание градиента концентраций АФК, регистрируемых до и после внесения порообразователя аламетицина к митохондриям может быть обусловлено повышением как антиоксидантного потенциала их матрикса, так и барьерных свойств внутренней мембраны, что вместе взятое вероятно способствует снижению «экспорта» АФК из органелл.

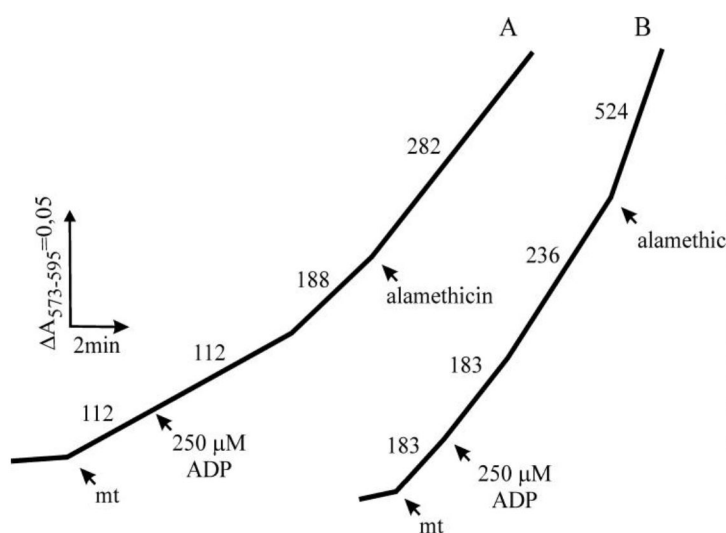


Рисунок 1 - Регистрация ВАФК в режиме реального времени в митохондриях, выделенных из проростков до (А) и после (В) холодной обработки (3-4°C, 6 сут.). Цифры над кривыми - пикомоли H_2O_2 /мин/мг белка

Figure 1 - Real-time detection of H_2O_2 production (pmol/min/mg protein) in mitochondria isolated from seedlings before (A) and after (B) cold acclimation (3-4°C, 6 d)

Визуализацию генерации АФК и мембранного потенциала митохондриями *in vivo* проводили после совместной загрузки соответствующих флуоресцентных красителей – DCFH2-DA и TMRM в интактные клетки колеоптилей в течение 30 мин при комнатной температуре. На рисунке 2А приведено типичное изображение дискретных точек свечения, детектируемых как индивидуальные митохондрии. Судя по величине флуоресценции TMRM, маркирующей локализацию митохондрий, высокая скорость генерации $\Delta\psi_{mt}$ была характерна для отдельных митохондрий контроля (рис.2В, кривая 1), тогда как после холодового воздействия она понижалась (рис.2С, рис.2D). Это может быть связано с потенциал-зависимым уменьшением степени загрузки красителя в митохондрии. Интенсивность флуоресценции DCF в субкортексе клеток контрольных образцов практически не отличалась от фоновой (рис.2В, кривая 2). На 1-е сут холодового стресса наблюдали увеличение флуоресценции DCF в областях интересов, причем пики флуоресценции обоих красителей совпадали, что свидетельствует о колокализации процессов генерации АФК и $\Delta\psi$ (рис.2С). Более длительное воздействие гипотермии вызывало снижение интенсивности свечения DCF в колокализованных с

митохондриями областей (рис.2D). Возможные причины этого могут быть обусловлены таковыми, выявленными для органелл *in vitro*, и, судя по всему, носят адаптивный характер.

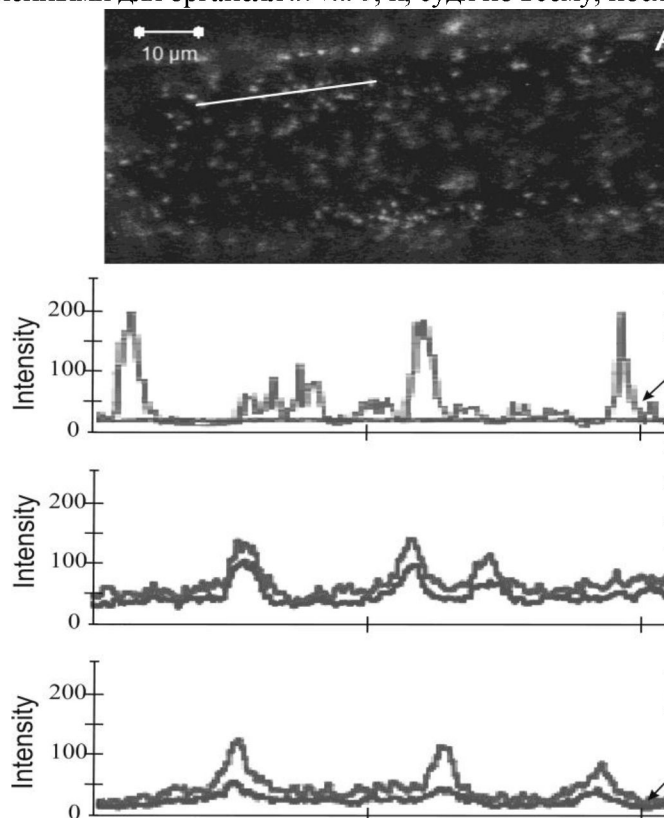


Рисунок 2 - Флуоресценция митохондрий *in vivo* в субкортикальном слое клетки coleoptilia (A) и профили интенсивностей свечения TMRM (1) и DCF (2) в клетках до (B), после 1сут (C) и 6сут (D) холодной обработки проростков. Отрезком линии (A) отмечена область интересов (пример)

Figure 2 - Imaging of mitochondria *in vivo* in subcortex of coleoptile cell (A) and profiles of fluorescence intensities of TMRM (1) and DCF (2) in cells before (B) and after 1d (C) or 6d (D) of cold acclimation. The line (A) shows a typical region of interest

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (проект №13-04-01828).

Литература

1. Cvetkovska M., Alber N.A., Vanlerberghe G.C. The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress // *Plant Signaling&Behavior*. 2013. V. 8. P.161-166.
2. Winterbourn C.C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells // *BBA*. 2014. V. 1840. P. 730-738.
3. Абдрахимова Й.Р., Андреев И.М., Шугаев А.Г. Участие диссипативных систем в контроле энергетической эффективности дыхания в митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы // *Физиология растений*. 2011.Т.58, №4. С.509-517.
4. Moreno-Sanches R.,Hernandez-Esquivel L., Rivero-Segura N.A., et al. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II - evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I// *FEBS Journal*. 2013. V. 280. P.927-938.
5. Gostimskaya I.S., Grivennikova V.G.,Zharova T.V.,Bakeeva L.E.,Vinogradov A.D. In situ of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria // *Analytical Biochemistry*. 2003. V. 313. P.46-52.

DETECTION OF ROS PRODUCTION IN WHEAT SEEDLING MITOCHONDRIA IN ORGANELLO AND IN VIVO: THE EFFECTS OF COLD ACCLIMATION

Abdrakhimova Y.R., Abdrakhimov F.A., Andreev I.M., Shugaev A.G.

Triticum aestivum, seedlings, mitochondria, in organello and in vivo, reactive oxygen species (ROS), alamethicin, fluorescent dyes, cold acclimation

Using a novel approaches with the specific fluorescent dyes optimized by us for real-time monitoring of ROS production in plant mitochondria *in vitro* and *in vivo*, it has been detected their cold-induced increase. But this was essential in isolated mitochondria permeabilized by the channel-former alamethicin indicating on their weak ROS “export” function, and a possible reasons are discussed in comparison with the results obtained in organelles in intact tissues.