

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ГЕНЕРАЦИИ АФК В МИТОХОНДРИЯХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ: НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРОВ ТЕРМИНАЛЬНЫХ ОКСИДАЗ

© 2015 г. Й. Р. Абдрахимова*,**, И. М. Андреев*, А. Г. Шугаев*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Поступила в редакцию 10.04.2014 г.

Исследовали возможность количественной оценки скорости генерации АФК митохондриями, выделенными из этиолированных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Мироновская 808), следя за аккумуляцией перекиси водорода в среде инкубации органелл с помощью новой высокочувствительной тест-системы, включающей флуорогенный индикатор Amplex Red и пероксидазу корневых хрена. Скорость процесса составляла около 100 пмоль H_2O_2 /(мг белка мин) в состоянии 3, увеличивалась почти в 2 раза при переходе митохондрий в состояние 4 и дополнительно возрастала более чем на 50% после добавления к ним антибиотика-порообразователя аламетицина, вызывающего пермеабиллизацию внутренней мембраны органелл для низкомолекулярных соединений, в том числе молекул H_2O_2 . Приведены экспериментальные доказательства того, что классические ингибиторы терминальных оксидаз дыхательной цепи митохондрий растений, такие как цианид, салицилгидроксамовая кислота и пропилгаллат, способны инактивировать АФК-детектирующие тест-системы *in vitro* путем взаимодействия с их функциональными компонентами. Эти результаты обсуждаются в сравнении с имеющимися в литературе данными, полученными с использованием аналогичных тест-систем, и указывают на существенные ограничения применения последних, в частности при выявлении антиоксидантной роли альтернативной цианид-резистентной оксидазы в митохондриях растений.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* – митохондрии – активные формы кислорода – флуоресцентные индикаторы – Amplex Red – аламетицин

DOI: 10.7868/S0015330314060025

ВВЕДЕНИЕ

Не снижающийся в течение последних десятилетий интерес к проблемам образования активных форм кислорода (АФК) и механизмам регуляции их метаболизма (генерации и удаления) обусловлен той важной ролью, которую они игра-

ют на протяжении всей жизнедеятельности клеток от деления до смерти [1]. Одними из наиболее обсуждаемых вопросов в биологии и биомедицине остаются те, что связаны с двойственной функцией АФК, генерируемых клетками при различных видах стресса. С одной стороны, это связано с выяснением механизмов развития патологических состояний организмов в результате окислительного стресса, возникающего вследствие нарушений редокс-баланса клеток, т.е. избыточной генерации АФК и их повреждающего действия на все ключевые структуры клетки, включая мембраны, белки и ДНК. С другой стороны, это обусловлено возможностью участия АФК в трансдукции тех или иных сигналов, и в частности наличием в клетках сигнальных путей, запускаемых АФК, в том числе от митохондрий [1–3]. Очевидно, что такого рода исследования

Сокращения: АО – альтернативная оксидаза (от *Alternative Oxidase*); ДМСО – диметилсульфоксид; СГК – салицилгидроксамовая кислота; AR – *Amplex Red*; DCF – дихлорофлуоресцеин; H_2DCFDA – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетат; FCCP – карбонилцианид-(*n*)-трифторметоксифенил-гидразон; HP – пероксидаза корневых хрена (от *Horseradish Peroxidase*); $V_{АФК}$ – скорость аккумуляции генерируемых митохондриями АФК снаружи органелл; $\Delta\psi_m$ – мембранный потенциал митохондрий.

Адрес для корреспонденции: Абдрахимова Йолдыз Раисовна. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Факс: +7 (499) 977-80-18; электронная почта: yoldez@mail.ru

требуют относительно быстрого и высокоспецифичного количественного определения скорости генерации АФК. Однако решение этой задачи существенно осложняется низкими внутриклеточными концентрациями АФК, транзитным характером изменений и относительно коротким периодом их жизни, а также наличием в клетках и отдельных органеллах достаточно эффективных систем антиоксидантной защиты [1, 4]. В связи с этим, остается актуальной проблема поиска и оптимизации методов адекватной оценки скорости образования АФК и быстрых изменений их внутриклеточной концентрации.

Известно, что широко применяемые флуоресцентные красители класса дихлорофлуоресцеинов (DCF) не лишены недостатков, которые детально рассмотрены в ряде обзоров последних лет [5, 6]. В настоящее время одним из относительно новых и наиболее высокочувствительных флуорогенных индикаторов для определения АФК *in vitro* является Amplex Red (AR), окисление которого путем его взаимодействия с H_2O_2 со стехиометрией 1 : 1 катализируется пероксидазой хрена (НР). Благодаря этому образуется спектрально различимый продукт этой реакции – резорурфин, который может быть идентифицирован как по его флуоресценции, так и по абсорбции [7]. Следует отметить, что хотя данная тест-система широко используется для определения скорости образования АФК митохондриями животных [8–12], примеры ее применения в аналогичных исследованиях, выполненных на растительных органеллах, единичны [2].

Целью наших исследований было определение скорости образования перекиси водорода в митохондриях, изолированных из проростков пшеницы, находящихся в различных метаболических состояниях, используя AR в качестве индикатора. Другая важная задача работы состояла в выяснении возможности применения ингибиторов терминальных оксидаз ЭТЦ, в частности альтернативной цианид-резистентной оксидазы (АО), для изучения их влияния на генерацию АФК митохондриями растений с помощью данной тест-системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительным материалом служили этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенные гидропонным способом на водопроводной воде при 23–24°C в течение 3 суток. Семена сортовой элиты были любезно предоставлены акад. И.Б. Сандухадзе (МосНИИСХ РАН, Немчиновка, Московская обл.).

Выделение митохондрий и контроль их функциональной активности проводили по методике,

детально описанной нами ранее [13]. Для этого побеги (колеоптили вместе с зародышевыми листьями) гомогенизировали со средой выделения (соотношение 1 : 6), содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.9), 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотрейтол и 0.1% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от ЖК. Выделенные путем дифференциального центрифугирования митохондрии ресуспендировали в малом объеме среды, содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.2) и 0.1% БСА, и помещали на лед на все время проведения экспериментов.

Поглощение кислорода митохондриями измеряли в реакционной среде, содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.2), 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ЭДТА, 0.1% БСА, при 25°C с использованием электрода типа Кларка (“Hansatech Instruments”, Англия). Скорости дыхания митохондрий при окислении 10 мМ малата в присутствии 10 мМ глутамата составляли в среднем 120–130 и 35–40 нмоль O_2 /(мг белка мин) в состоянии 3 (после добавления 200 мкМ АДФ) и состоянии 4 (после его исчерпания в процессе фосфорилирования), соответственно. Коэффициенты дыхательного контроля по Чансу и отношения АДФ/О [14] в среднем составляли 3.5 и 3.0, соответственно. Выделенные митохондрии были способны к быстрой и стабильной в течение длительного времени генерации трансмембранного потенциала на внутренней мембране ($\Delta\psi_m$), за которой следили, используя сафранин О [13].

Образование АФК митохондриями тестировали сразу после выделения органелл, используя AR (N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин) в комбинации с пероксидазой хрена (НР). Измерения проводили в стандартной реакционной среде, содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.2), 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ЭДТА, 0.1% БСА, 5 мМ малат, 5 мМ глутамат и 0.15–0.2 мг/мл белка митохондрий. Соотношение компонентов тест-системы для опытов подбирали эмпирически, в большинстве проб оно составляло 10 мкМ AR и 1–10 ед./мл НР. Образование резорурфина – продукта реакции взаимодействия AR с H_2O_2 – регистрировали спектрофотометрически, следя за изменением дифференциальной абсорбции ($\Delta A_{573-595}$) на спектрофотометре Hitachi-557 [10]. Интенсивность флуоресценции резорурфина измеряли на спектрофлуориметре Hitachi-850 (длина волны возбуждения – 564 нм, регистрации – 587 нм) [2]. В случае использования другого индикатора, 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин-диацетата (H_2DCFDA), флуоресценцию его деацетилированного и окисленного продукта DCF возбуждали светом с длиной волны 480 нм и регистрировали при 552 нм [7, 15, 16]. Чувствительность выбранных тест-систем проверяли до-

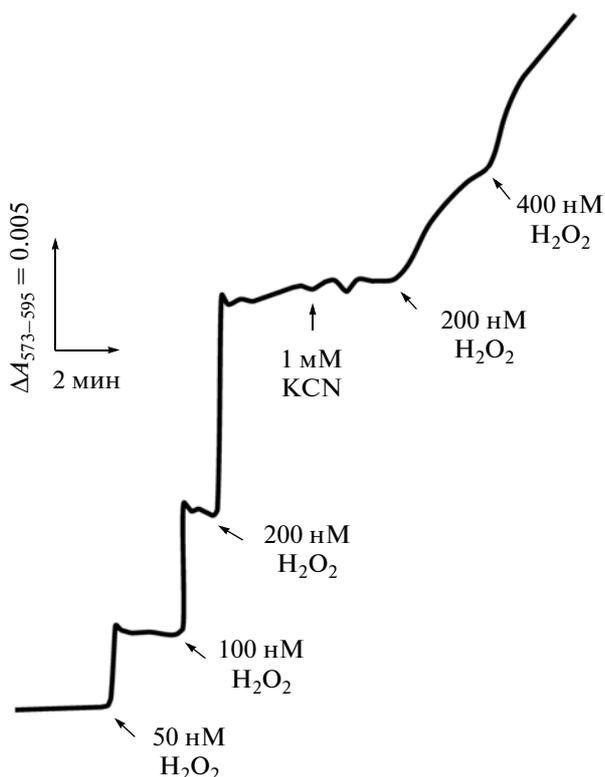


Рис. 1. Зависимость величины абсорбционного сигнала резорурфина от концентрации H_2O_2 в реакционной среде, не содержащей митохондрий, и влияние на сигнал 1 мМ KCN.

Остальные условия указаны в разделе “МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ”.

бавлением к ним 50–100 нМ свежеприготовленного раствора H_2O_2 в конце каждой пробы.

Содержание митохондриального белка в пробах определяли по методу Lowry с соавт. [17], используя БСА в качестве стандарта.

Реактивы. В работе использовали KCN, KH_2PO_4 и другие соли отечественного производства марки о. с. ч. или х. ч.; сахарозу, субстраты, нуклеотиды, пероксидазу, ЭДТА, БСА, аламетицин, H_2DCFDA — фирмы “Sigma” (США); Amplex Red — фирмы “Invitrogen” (США).

Статистика. Каждый опыт проводили в 3–4 биологических и 2–3 аналитических повторностях. На рисунках представлены результаты характерных опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как известно, потенциальные возможности любой тест-системы определяются степенью ее чувствительности и специфичности. Исходя из этого, прежде всего необходимо было протестировать влияние H_2O_2 и других использованных в работе реагентов на поведение самой тест-систе-

мы на основе AR, а именно флуоресценцию/абсорбцию резорурфина в реакционной смеси, в том числе при отсутствии в ней митохондрий с целью исключения нежелательных побочных эффектов. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что внесение перекиси водорода в реакционную среду сопровождалось быстрым и почти пропорциональным ее концентрации увеличением абсорбционного сигнала резорурфина, позволяя тем самым надежно обнаруживать ее концентрации менее 45–50 нМ, что соответствует приведенным в литературе характеристикам [5–7]. Можно видеть, однако, что добавление к реакционной смеси KCN (ингибитора цитохромоксидазы) привело к явному снижению чувствительности тест-системы, о чем судили как по существенному замедлению кинетики абсорбционного сигнала резорурфина, вызываемого последующим добавлением к системе H_2O_2 , так и по выраженной утрате зависимости его величины от концентрации перекиси (рис. 1). Очевидно, что этот факт необходимо учитывать при объяснении получаемых результатов, поскольку наблюдаемое резкое падение уровня генерации АФК митохондриями может быть ошибочно истолковано как следствие блокирования основного цитохромного пути транспорта электронов и активации в таких условиях альтернативной оксидазы (АО). По сравнению с KCN добавление к реакционной смеси известных ингибиторов АО — 1 мМ салицилгидроксамой кислоты (СГК) или 1 мкМ пропилгаллата (данные не приведены) — вызывало более быструю инактивацию АФК-детектирующей системы, причем как с митохондриями (рис. 2), так и без них (не показано). На рис. 2 также видно, что эквивалентные количества растворителя этих ингибиторов — диметилсульфоксида (ДМСО) — не влияли на чувствительность тест-системы, проверяемую последующим добавлением H_2O_2 .

Выраженные побочные эффекты СГК были обнаружены нами и при попытке выяснить, какое влияние оказывает функционирование АО на скорость образования АФК митохондриями растений, используя для этой цели другой известный индикатор — дихлородигидрофлуоресцеин-ди-ацетат, деацетилированная форма которого (H_2DCF) в присутствии пероксидазы и перекиси водорода способна окисляться до флуоресцирующего продукта этой реакции DCF [5–7]. Оказалось, что ответная реакция самой тест-системы, т.е. в отсутствие митохондрий в реакционной смеси, вызываемая добавлением к ней СГК, представляет собой резкое увеличение ее флуоресценции, имитирующее появление в среде высокой концентрации H_2O_2 (рис. 3). Неспецифичный характер этого ответа, очевидно, следует из того факта, что он развивается на фоне полной утраты чувствительности самой тест-системы к

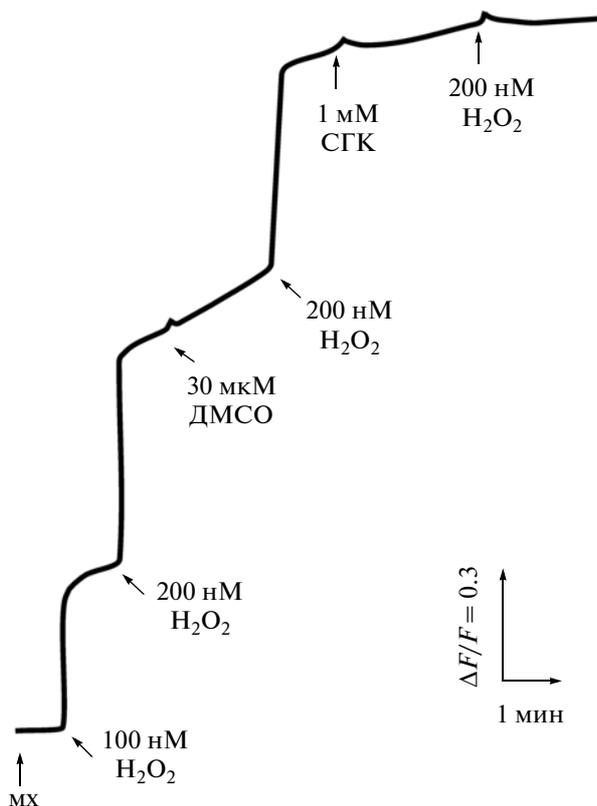


Рис. 2. Зависимость величины флуоресценции резорифина от концентрации H_2O_2 в реакционной среде в присутствии митохондрий (мх) пшеницы и влияние на сигнал 1 мМ СГК. СГК и его растворитель ДМСО добавляли в эквивалентном количестве (2 мкл/мл). Остальные условия указаны в разделе “МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ”.

H_2O_2 (рис. 3). Мы полагаем, что исходная флуоресценция данной тест-системы, наблюдаемая в наших экспериментах, обусловлена присутствием некоторого количества деацетилированной формы красителя, поскольку реакцию на вторую добавку перекиси водорода уже не регистрировали (рис. 3). Очевидно, что отмеченные выше побочные, неспецифические эффекты известных блокаторов дыхательной цепи на поведение изученных тест-систем заслуживают особого внимания, так как они резко ограничивают возможность выявления взаимосвязи между скоростью генерации АФК митохондриями и изменениями под влиянием соответствующих ингибиторов активности терминальных оксидаз ЭТЦ.

Проведенные нами эксперименты с использованием АР показали, что скорость аккумуляции H_2O_2 в среде инкубации митохондрий пшеницы ($V_{\text{АФК}}$) при окислении ими малата в присутствии глутамата составляла примерно 110 пмоль H_2O_2 /(мг белка мин) (рис. 4). При этом выяснилось, что переход митохондрий из метаболиче-

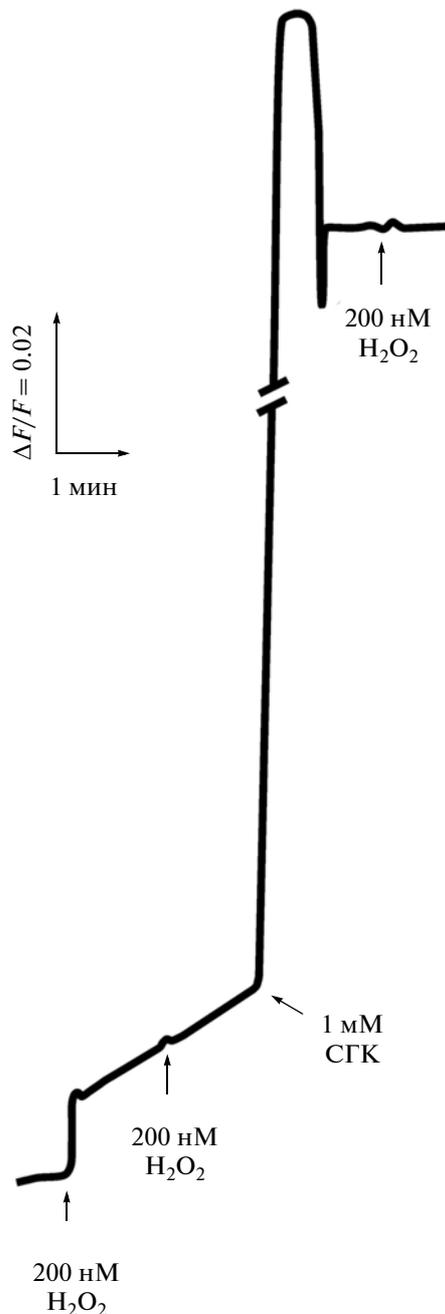


Рис. 3. Зависимость величины флуоресцентного сигнала DCF от присутствия 200 нМ H_2O_2 в реакционной среде и влияние на сигнал 1 мМ СГК. Остальные условия указаны в разделе “МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ”.

ского состояния 3 (после добавки АДФ) в состояние 4 (после истощения добавленного АДФ в процессе фосфорилирования) сопровождался увеличением $V_{\text{АФК}}$ более чем на 70% (рис. 4). Кроме того, найдено, что истинная скорость генерации АФК в митохондриях пшеницы гораздо выше их скорости аккумуляции снаружи органелл, что

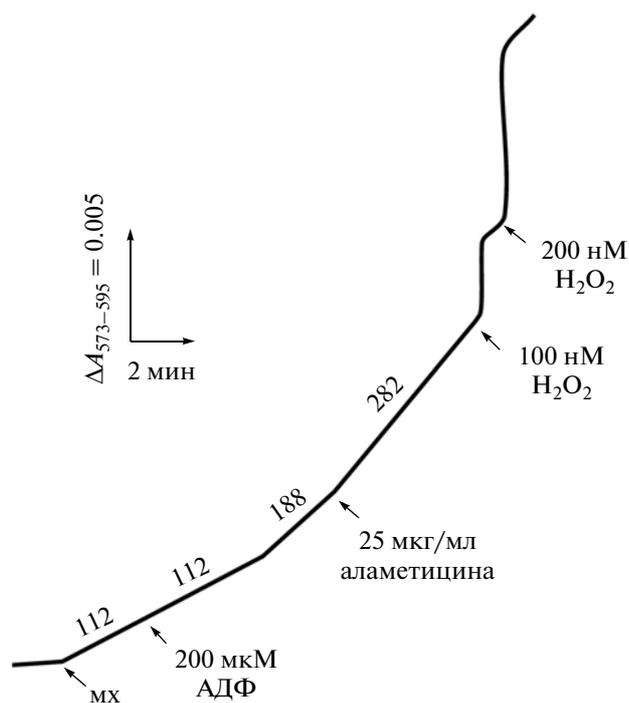


Рис. 4. Кинетика аккумуляции в реакционной среде H_2O_2 , продуцируемой митохондриями (мх) пшеницы в различных метаболических состояниях, и действие на нее 25 мкг/мл аламетицина.

Цифры над кривой означают скорости образования H_2O_2 , пмоль/(мг белка мин). Остальные условия указаны в разделе “МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ”.

было выявлено с помощью антибиотика аламетицина, способного вызывать пермеабиллизацию внутренней мембраны для небольших гидрофильных молекул, в том числе АФК [18]. Так, при добавлении 25 мкг/мл аламетицина к митохондриям наблюдали увеличение $V_{\text{АФК}}$ в среднем на 50% (рис. 4), причем чувствительность выбранной тест-системы к H_2O_2 сохранялась и после инкубации органелл в течение 30 мин в присутствии этого антибиотика (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что АФК-детектирующие системы на основе флуоресцентных красителей, широко применяемые в современной практике биологических и биомедицинских исследований, обладают достаточно высокой чувствительностью и позволяют определять уровень различных форм АФК, в частности перекиси водорода, как в intactных тканях и клетках, так и в изолированных органеллах, включая митохондрии. Вместе с тем в литературе накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что использование этих методов определения АФК требует большой осторожности в интерпретации полученных ре-

зультатов, в частности из-за наличия неспецифических реакций, в которые могут вступать компоненты системы [10, 11, 19, 20]. Имеются данные, однозначно указывающие на артефактный характер прямого взаимодействия СГК с H_2DCFDA , способного приводить к резкому повышению флуоресценции раствора даже в анаэробных условиях, что было интерпретировано как проявление эстеразоподобного действия этого ингибитора АО [19].

В наших опытах также было найдено, что добавление к тест-системе $H_2DCFDA + HP$ того же ингибитора приводило к резкому увеличению флуоресценции реакционной смеси и далее к полной потере чувствительности индикатора к перекиси водорода (рис. 3). На возможность прямого взаимодействия другого ингибитора АО, пропилгаллата, с AR-системой указывается и в недавно опубликованной работе El-Khouly с соавт. [11]. В связи с этим следует также отметить работу Maxwell с соавт. [20], выполненную на протопластах клеток табака, где с целью выяснения влияния активности АО на генерацию АФК митохондриями и предотвращения возможных побочных эффектов СГК на H_2DCFDA были использованы трансгенные линии табака с генетически измененным уровнем экспрессии и активности АО.

Анализ литературных данных и наших собственных результатов свидетельствует о том, что классические ингибиторы терминальных оксидаз митохондрий растений могут оказывать существенное влияние на АФК-детектирующие системы как путем инактивации ими пероксидазы, так и вследствие непосредственного взаимодействия с самими индикаторами. На это, по-видимому, указывает и резкое увеличение интенсивности флуоресценции DCF после добавления СГК к выделенным митохондриям гороха, что без соответствующего контроля чувствительности $H_2DCFDA + HP$ к АФК в присутствии СГК было интерпретировано как значительная активация их образования в результате ингибирования АО [15]. И наоборот, отсутствие соответствующего сигнала этого индикатора в присутствии KCN было приписано снижению $V_{\text{АФК}}$ в результате ингибирования цитохромного пути окисления и сопряженной с ним активации АО [21]. Сходные результаты опытов, проведенных на выделенных митохондриях проростков пшеницы авторами работы [16], также могли быть неверно интерпретированы как усиление генерации АФК в результате блокирования АО, хотя в последнем случае использовалась не СГК, а другое производное гидроксаматов — бензгидроксамовая кислота. Недавно была показана сходная степень аффинности при связывании HP с обеими гидроксамовыми кислотами [22]. Таким образом, литератур-

ные данные и результаты, полученные нами с использованием аналогичных тест-систем (рис. 1–3), указывают на большие сложности применения ингибиторного анализа для получения строгих экспериментальных доказательств антиоксидантной роли АО на изолированных митохондриях растений.

Использование AR-системы для определения скорости генерации АФК ($V_{\text{АФК}}$) в митохондриях, выделенных из этиолированных проростков озимой пшеницы (рис. 4), показало, что ее значения в целом сравнимы с теми, что были получены на митохондриях из ряда других растительных и животных объектов [2, 10, 12, 15]. Так, в цитированной выше работе [15] скорость образования АФК в митохондриях, выделенных из этиолированных проростков гороха, при окислении ими сукцината составляла 130–150 пмоль H_2O_2 /(мг белка мин). Вместе с тем следует отметить, что величины $V_{\text{АФК}}$, приведенные в литературных источниках, сильно варьируют и могут отличаться друг от друга в десятки раз, причем даже для органелл, полученных из сходных объектов. Например, для окисляющих сукцинат митохондрий из этиолированных проростков гороха при использовании H_2DCFDA + НР было найдено, что скорость продукции в них АФК превышала 1.3 нмоль H_2O_2 /(мг белка мин) [23]. В ряде недавних публикаций было показано, что митохондрии животных, в частности органеллы из клеток сердечной мышцы крысы и свиньи, характеризуются $V_{\text{АФК}}$ не более 100–200 пмоль H_2O_2 /(мг белка мин), что в свою очередь соответствовало 0.1–0.2% от общей скорости дыхания при 37°C [10, 12]. В обстоятельной работе других авторов [24] показана высокая субстратная и органная специфичность генерации АФК в митохондриях, скорость которой варьировала от 0.1% (состояние 3) до 3% (состояние 4) от скорости дыхания.

Наши расчеты того же параметра для митохондрий из тканей проростков озимой пшеницы, окисляющих малат, показали, что его величина составляет примерно 0.1 и 0.5% для состояний 3 и 4 соответственно. Не исключено, что эта 5-кратная разница могла быть обусловлена увеличением в состоянии 4 мембранного потенциала митохондрий примерно на 30% (рис. 4, см. также [13]). Согласно имеющимся в литературе сообщениям, стимуляция образования АФК, обусловленная повышением $\Delta\psi_m$, способна предотвращаться запуском механизма “мягкого разобщения” [25], основанного на активации энергодиссипирующих систем митохондрий, которые способствуют поддержанию в них более низкого уровня $\Delta\psi_m$ [8, 25]. В связи с этим, одна из возможных причин относительно низкой скорости генерации АФК митохондриями пшеницы состоит в высокой конститутивной активности в них АО, которая в

зависимости от субстрата окисления может достигать 30–50% от скорости общего дыхания [13]. С другой стороны, относительно низкая измеренная нами величина $V_{\text{АФК}}$ может быть следствием и того факта, что она отражает скорость выхода АФК из митохондрий, но не истинную скорость их генерации внутри органелл, как об этом свидетельствуют результаты экспериментов с аламетицином. С помощью данного антибиотика выявлена существенная разница в скоростях эмиссии и собственно генерации АФК в матриксе, указывая на то, что $V_{\text{АФК}}$ заметным образом лимитируется проницаемостью внутренней мембраны митохондрий для H_2O_2 (рис. 4), что было ранее установлено и для животных органелл [18, 26].

На основании полученных в работе результатов можно заключить, что новые высокочувствительные АФК-детектирующие системы на основе флуорогенных индикаторов, и в первую очередь AR, позволяют оценить скорость образования перекиси водорода в растительных митохондриях *in vitro* в зависимости от их функционального состояния. Использование антибиотика аламетицина показало, что измеренная с помощью такого подхода скорость аккумуляции H_2O_2 в среде инкубации органелл на самом деле не отражает истинной и заметно более высокой скорости их генерации в митохондриях. Обнаруженные в настоящей работе выраженные побочные эффекты классических ингибиторов терминальных оксидаз ЭТЦ митохондрий растений на поведение изученных тест-систем, связанные с потерей последними чувствительности к АФК, позволяют заключить, что выявление с их помощью антиоксидантной роли АО существенно осложняется и, по-видимому, требует использования других подходов.

Авторы благодарят сотрудников кафедры биохимии биологического факультета МГУ Веру Георгиевну Гривенникову и Андрея Дмитриевича Виноградова за ценные советы при выполнении экспериментов с применением аламетицина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-04-01828), а также за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schwarzländer M., Finkemeier I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants // *Antiox. Redox Signal.* 2013. V. 18. P. 2122–2144.
2. Gleason C., Huang S., Thatcher L.F., Foley R.C., Anderson C.R., Carroll A.J., Millar A.H., Singh K.B. Mitochondrial complex II has a key role in mitochon-

- drial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 10 768–10 773.
3. *Cvetkovska M., Alber N.A., Vanlerberghe G.C.* The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8. P. 161–166.
 4. *Dinakar C., Abhaypratar V., Yearla S.R., Raghavendra A.S., Padmasree K.* Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation // Planta. 2010. V. 231. P. 461–474.
 5. *Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J. II, Ischiropoulos H.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // Free Radic. Biol. Med. 2012. V. 52. P. 1–6.
 6. *Winterbourn C.C.* The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells // Biochem. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 730–738.
 7. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies / Eds. Johnson I., Spence M.T.Z.* USA: Life Technology Corporation, 2010. 1090 p.
 8. *Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А.* Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 246–264.
 9. *Grivennikova V.G., Vinogradov A.D.* Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I // Biochem. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. P. 446–454.
 10. *Moreno-Sánchez R., Hernández-Esquivel L., Rivero-Segura N.A., Marin-Hernández A., Neuzil J., Ralph S.J., Rodriguez-Enriquez S.* Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II – evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I // FEBS J. 2013. V. 280. P. 927–938.
 11. *El-Khoury R., Dufour E., Rak M., Ramanantsoa N., Grandchamp N., Csaba Z., Duvillié B., Benit P., Gallego J., Gressens P., Sarkis C., Jacobs H.T., Rustin P.* Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome *c* oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction // PLoS Genet. 2013. V. 9: e1003182.
 12. *Cortassa S., O'Rourke B., Aon M.A.* Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS // Biochem. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 287–295.
 13. *Абдрахимова Й.Р., Андреев И.М., Шугаев А.Г.* Участие диссипативных систем в контроле энергетической эффективности дыхания в митохондриях этилированных проростков озимой пшеницы // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 509–517.
 14. *Chance B., Williams G.R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. 1956. V. 17. P. 65–134.
 15. *Попов В.Н., Рууге Э.К., Старков А.А.* Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 910–916.
 16. *Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Павловская Н.С., Королева Н.А., Боровик О.А., Любушкина И.В., Войников В.К.* Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодом закаливании // Биол. мембраны. 2011. Т. 28. С. 274–283.
 17. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
 18. *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 // Anal. Biochem. 2003. V. 313. P. 46–52.
 19. *Hsiao K.C., Bornman C.H.* Salicylhydroxamic acid mimics esterase-like action // J. Exp. Bot. 1993. V. 44. P. 1847–1849.
 20. *Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.* The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8271–8276.
 21. *Popov V.N., Simonian R.A., Skulachev V.P., Starkov A.A.* Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria // FEBS Lett. 1997. V. 415. P. 87–90.
 22. *Quellet M., Aitken S.M., English A.M., Percival M.D.* Aromatic hydroxamic acids and hydrazides as inhibitors of the peroxidase activity of prostaglandin H₂ synthase-2 // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 431. P. 107–118.
 23. *Braidot E., Petrusa E., Vianello A., Macri F.* Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates // FEBS Lett. 1999. V. 451. P. 347–350.
 24. *Tahara E., Navarete F.D.T., Kowaltoaski A.J.* Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation // Free Rad. Biol. Med. 2009. V. 46. P. 1283–1297.
 25. *Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A.* High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // FEBS Lett. 1997. V. 416. P. 15–18.
 26. *Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д.* Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биол. химии. 2013. Т. 53. С. 245–296.