

На правах рукописи

Дмитриева Светлана Анатольевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК КОРНЕЙ
ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Минибаева Фарида Вилевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шакирова Фарида Миннихановна

доктор биологических наук
Сальников Вадим Владимирович

Ведущая организация: Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского

Защита состоится «__» _____ 2008 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, а/я 30, ул. Лобачевского, 2/31, тел./факс: (843) 292 73 47.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «____» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Активные формы кислорода (АФК) в настоящее время рассматривают как сигнальные молекулы, их роль показана в стрессовых ответах при осуществлении программ пролиферации и дифференцировки, естественного и индуцированного старения, гибели клеток растений (Sauer et al., 2001; Van Breusegem, Dat, 2006). Большое значение в регуляции физиологических процессов в растительных клетках АФК имеет тонкий баланс между их функционированием в качестве сигнальных молекул и токсическими эффектами, индуцированными избыточным накоплением кислородных радикалов. При накоплении АФК происходит повреждение жизненно важных макромолекул, в том числе нуклеиновых кислот, белков и липидов. Поддержание редокс-гомеостаза является одним из важных условий нормальной жизнедеятельности клетки, что придает исследованиям механизмов редокс-регулируемых различных физиологических процессов актуальность.

Одними из основных органелл, генерирующих АФК и регулирующих редокс-потенциал клетки, являются митохондрии (Navrot, 2007). Установлено, что изменения, происходящие в митохондриях, влияют на различные аспекты адаптации и гибели клеток посредством освобождения ряда митохондриальных белков, рассеивания трансмембранной разности потенциалов, образования активных форм кислорода и азота, нарушения в работе электрон-транспортной цепи и торможения синтеза АТФ (Бра и др., 2005). Несмотря на наличие в митохондриях мощной системы антиоксидантной защиты, митохондриальные мембраны, ДНК и белки могут повреждаться при накоплении АФК (Taylor et al., 2005). Интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриальных мембранах приводит к нарушению целостности мембран, набуханию и последующему лизису митохондрий (Rhoads et al., 2006). Повреждения структуры митохондрий, являющихся основными энергообразующими органеллами, в условиях окислительного стресса могут привести к нарушению энергообеспечения клеток, необходимого для адаптации в стрессовых условиях. Большинство работ по изучению влияния АФК на структурно-функциональное состояние митохондрий проводилось на выделенных митохондриях. Изучение структурно-функциональных изменений митохондрий, а также ультраструктурных перестроек других органелл клеток в растительных тканях при действии прооксидантов не проводилось.

Несмотря на то, что в настоящее время активно изучаются антиоксидантные ферменты, окислительные метаболиты и идентифицированы многие гены, кодирующие стрессовые белки и специфические регуляторные элементы, многие вопросы, касающиеся изменений ультраструктуры клеточных органелл в условиях окислительного стресса, до сих пор остаются открытыми. В частности, какова взаимосвязь между структурно-функциональными изменениями органелл, энергетическим статусом и жизнеспособностью растительных клеток при изменении

окислительно-восстановительных условий? Особую важность при этом приобретает комплексный подход изучения морфологических изменений в клетках совместно с биохимическими и физиологическими изменениями на тканевом уровне.

Цель и задачи исследований. Целью проведенной работы явилось выявление ультраструктурных перестроек и функциональных изменений в клетках корней пшеницы в условиях окислительного стресса.

Были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику содержания АФК и уровень перекисного окисления липидов в клетках корней пшеницы при действии прооксидантов: параквата, салициловой кислоты, ионов лития;
2. Охарактеризовать динамику структурных и функциональных изменений митохондрий в клетках корней при развитии окислительного стресса;
3. Исследовать изменения ультраструктуры органелл в клетках корней при действии прооксидантов;
4. Выявить изменения проницаемости плазматической мембраны для ионов калия и протонов в условиях окислительного стресса;
5. Исследовать рост и митотическую активность клеток корней пшеницы при действии прооксидантов.

Научная новизна работы.

1. Впервые выявлено, что в условиях окислительного стресса увеличение потребления кислорода корнями не сопровождается усилением дыхательной активности митохондрий, а обусловлено преимущественным восстановлением кислорода при генерации АФК; 2. В условиях окислительного стресса выявлены изменения ультратонкой организации митохондрий (тороидальная, «С-образная» формы митохондрий, просветление матрикса и редукция крист) которые сопровождаются снижением митохондриального мембранного потенциала; 3. Впервые показано, что при индуцировании окислительного стресса происходит образование большого количества аутолитических вакуолей, содержащих участки цитоплазмы и органеллы, преимущественно митохондрии; 4. Впервые обнаружено, что при действии СК ингибирование деления и гибель части клеток корня обусловлены прооксидантными и протонофорными свойствами СК; 5. Впервые обнаружено, что ионы лития приводят к развитию в растительных клетках окислительного стресса.

Практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования значительно дополняют и расширяют существующие представления о роли окислительного стресса в изменении морфологии и функционировании растительных клеток и могут быть использованы в учебном процессе.

Связь работы с научными программами. Работа проводилась в рамках исследований по плану НИР лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма КИББ КазНЦ РАН «Функционирование апопластных и внутриклеточных окислительно-восстановительных систем растительных клеток» (№

0120.0 803028), поддержана грантом РФФИ № 06-04-48143, грантом президента РФ для поддержки ведущих научных школ № НШ-5492.2008.4.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), всероссийской конференции молодых ученых и II школе им. академика Н.М. Эммануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» (Москва, 2006), международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), всероссийской конференции «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2007), международной конференции «SFRR Plant Oxygen Group meeting» (Gent, Belgium, 2007), международной конференции «Desiccation Tolerance of Plants» (Drakensberg, South Africa, 2007), VI Съезде общества физиологов растений «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), IV съезде «Российского общества биохимиков и молекулярных биологов» (Новосибирск, 2008), международном симпозиуме «Липиды и оксипирины растений» (Казань, 2008), итоговых научных конференциях КИББ КНЦ РАН (2004, 2005, 2006, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 18 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 180 источников.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Объект исследований. В качестве объекта исследования были использованы корни проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Люба и гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Тан. Проростки выращивали на растворе 0,25 мМ CaCl₂ в течение 1-5 дней при +22°C. Навеску корней (250 мг) инкубировали в соответствующих инкубационных растворах (3 мл; pH 7.0) при +25°C.

1.2. Определение содержания перекиси водорода, супероксидного анион-радикала, интенсивности ПОЛ. Содержание H₂O₂ определяли в растворе инкубации и растворимой фракции гомогената с использованием ксиленола оранжевого ($\lambda = 560$ нм). Концентрацию H₂O₂ рассчитывали по калибровочной кривой. Количество супероксида определяли с использованием эпинефрина ($\lambda = 480$ нм). Интенсивность ПОЛ определяли в растворимой фракции гомогената по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) ($\lambda = 560$ нм). Уровень ПОЛ выражали в процентах, за 100% принимали количество ТБК-прореагировавших продуктов, содержащихся в клетках исходных корней.

1.3. Определение интенсивности потребления кислорода. Интенсивность поглощения кислорода отсеченными корнями определяли манометрическим методом

Варбурга (Семихатова, Чулановская, 1965). Интенсивность дыхания измеряли каждый час в течение 6 часов.

1.4. Определение проницаемости плазмалеммы корневых клеток для ионов калия и протонов. Проницаемость плазмалеммы корневых клеток для ионов калия оценивали по содержанию K^+ в инкубационном растворе после инкубации отсеченных корней пшеницы. Измерения проводили на пламенном фотометре Phlapho-41 (Carl Zeiss, Jena, Германия). Измерения pH среды проводили на pH-метре (Mettler Toledo, США) после извлечения корней из среды инкубации.

1.5. Определение митотического индекса (МИ) и жизнеспособности клеток. Зафиксированный в реактиве Кларка материал окрашивали при нагревании в ацетоорсеине. МИ рассчитывали в процентах (количество делящихся клеток от общего количества клеток). Количество аномальных анафаз (АА) рассчитывали в процентах от количества клеток на стадии анафазы. Клетки корневой апикальной меристемы анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Jena, Германия) при увеличении $\times 600$. Для каждого варианта опыта было проанализировано не менее 5 тыс. клеток. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,02% раствора Эванса синего. Долю живых клеток оценивали в зоне растяжения по количеству неокрашенных клеток с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Jena, Германия).

1.6. Определение мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий оценивали в клетках зоны растяжения с помощью специфического флуоресцентного красителя тетраметилродамина (λ_{ab} 543 нм / λ_{em} 573 нм). Исследования проводили с помощью конфокального микроскопа LSM-510 META (Carl Zeiss, Jena, Германия).

1.7. Исследование ультраструктуры клеток. Фиксацию и подготовку препаратов для электронно-микроскопического исследования проводили по методике, описанной в (Пономарева и др., 2002). Для анализа ультраструктуры были использованы кусочки ткани корня (1-2 мм) из зоны растяжения. На поперечном срезе корня анализировали ультраструктуру клеток центрального цилиндра. Исследования проводили с помощью электронного микроскопа JEM1200 EX (JOEL, Япония).

Все опыты проводили в 3 биологических и 3-5 аналитических повторностях. Статистическая обработка результатов производилась с использованием t -критерия Стьюдента. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия от контроля ($P < 0,05$).

Условные обозначения к электронно-микроскопическим фотографиям: АВ – аутолитическая вакуоль; АГ – аппарат Гольджи; В – вакуоль; Гх – гетерохроматин; КС – клеточная стенка; ЛК – липидная капля; Лм – ламосома; Мх – митохондрия; П – пластида; Пр – пероксисома; ПМ – плазматическая мембрана; Р – рибосомы; Т – тонопласт; Хр – хроматин; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Я – ядро; Ядр – ядрышко; ЯМ – ядерная мембран.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Окислительный стресс и гибель клеток при действии параквата

Для изучения динамики структурно–функциональных изменений в клетках при окислительном стрессе мы провели исследование при действии специфического прооксиданта параквата (Пк) в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ. Токсическое действие Пк обусловлено индукцией в клетках свободнорадикальных процессов. Он легко проникает в клетки и в результате ферментативного восстановления превращается в свободный монокатион-радикал, способный взаимодействовать с кислородом с образованием супероксидного анион-радикала (Hart et al., 1993).

Воздействие Пк на корни привело к развитию в клетках окислительного стресса, в частности, увеличению содержания H_2O_2 в клетках и увеличению уровня ПОЛ (табл. 1). Максимальная интенсивность ПОЛ наблюдалась при использовании 100 мкМ Пк (табл. 1), что позволяет предположить, что в этой концентрации Пк оказывает сильное деструктивное воздействие на мембранные структуры клетки. Целостность плазматической мембраны можно косвенно оценить по изменению проницаемости плазмалеммы для ионов калия и протонов. В наших экспериментах при воздействии Пк происходил выход из клеток ионов K^+ и последующее их поглощение, подобно тому, как это происходило в контроле, а также наблюдалось подщелачивание среды инкубации на 0,6 ед. рН (табл. 2). При действии 100 мкМ Пк подщелачивание среды инкубации сменялось значительным подкислением и наблюдался повторный значительный выход ионов K^+ из клеток (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о нарушении проницаемости клеточной мембраны и ее повреждении.

Таблица 1. Изменение содержания H_2O_2 и уровня ПОЛ в отсеченных корнях пшеницы при инкубации в течение 6 часов в растворах Пк.

Варианты	Параметры	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	8,6 ± 0,9	11,0 ± 1,6	13,7 ± 0,6
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2
	ПОЛ, %	108 ± 15	98 ± 15	102 ± 11
Пк (1 мкМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	12,7 ± 0,6	17,8 ± 0,9	21,2 ± 1,3
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	7,4 ± 0,4	9,5 ± 0,3	11,0 ± 0,6
	ПОЛ, %	112 ± 9	129 ± 9	148 ± 8
Пк (10 мкМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	11,9 ± 0,6	18,9 ± 0,9	16,1 ± 0,8
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	9,3 ± 0,6	8,7 ± 0,7	10,4 ± 0,7
	ПОЛ, %	131 ± 14	151 ± 15	153 ± 14
Пк (100 мкМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	12,6 ± 0,1	18,1 ± 0,2	17,6 ± 0,2
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	8,8 ± 0,7	9,5 ± 0,9	12,3 ± 0,9
	ПОЛ, %	171 ± 8	174 ± 8	187 ± 12

Примечание: ^а – содержание H_2O_2 в растворимой фракции гомогената, ^б – содержание H_2O_2 в растворе инкубации.

Таблица 2. Изменение рН и содержания ионов калия в среде инкубации при 6-часовой обработке корней пшеницы Пк.

Варианты	Параметры	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	рН	6,2 ± 0,2	5,9 ± 0,3	6,1 ± 0,1
	K ⁺ , мкэкв/г сыр.в.	2,7 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1
Пк (1 мкМ)	рН	6,4 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2
	K ⁺ , мкэкв/г сыр.в.	2,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Пк (10 мкМ)	рН	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,3	6,7 ± 0,2
	K ⁺ , мкэкв/г сыр.в.	2,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0
Пк (100 мкМ)	рН	6,7 ± 0,3	6,7 ± 0,2	5,5 ± 0,1
	K ⁺ , мкэкв/г сыр.в.	3,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	5,4 ± 0,4

Токсическое действие Пк на процессы роста и развития, обусловленное развитием окислительного стресса, проявляется в тканях различных организмов (Breazeale, Camper, 1972; Simontacchi et al., 1993; Gonzalez-Polo et al., 2004; Peng et al., 2004). В наших экспериментах обработка растений Пк привела к значительному подавлению роста и развития проростков пшеницы. Инкубация 5-суточных корней в течение 6 ч приводила к значительному снижению митотической активности корневых клеток на 25, 39 и 80 % при использовании 1, 10 и 100 мкМ Пк соответственно. Таким образом, развитие в клетках окислительного стресса при действии Пк приводило к ингибированию деления клеток и роста корней пшеницы.

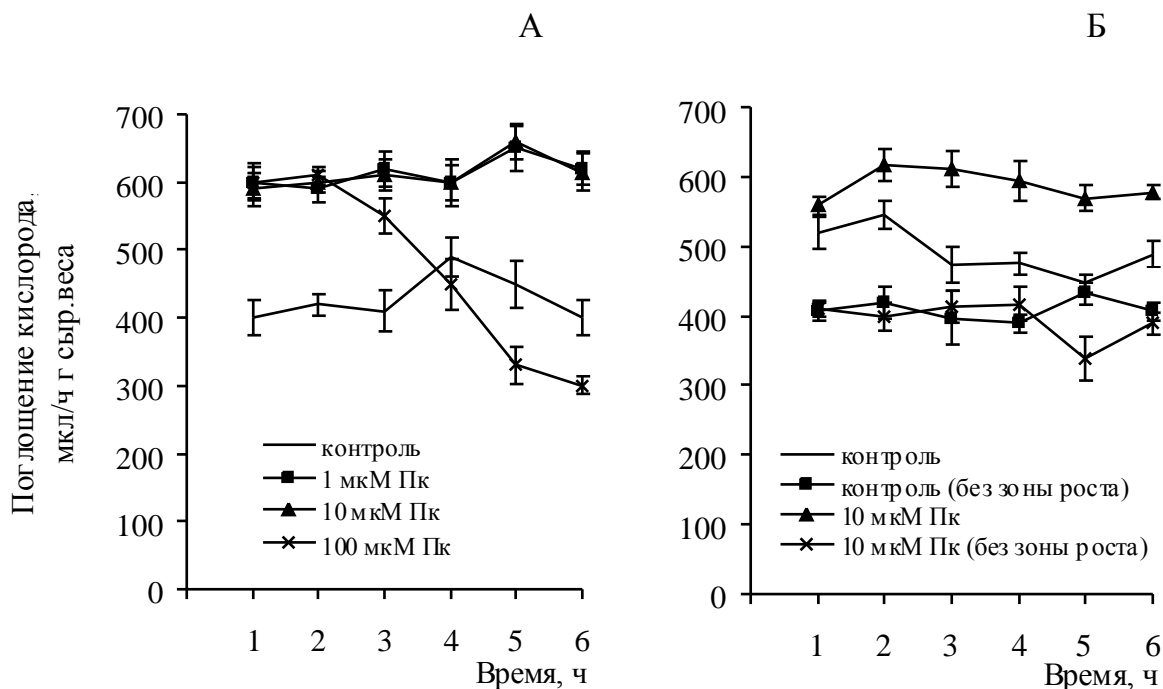


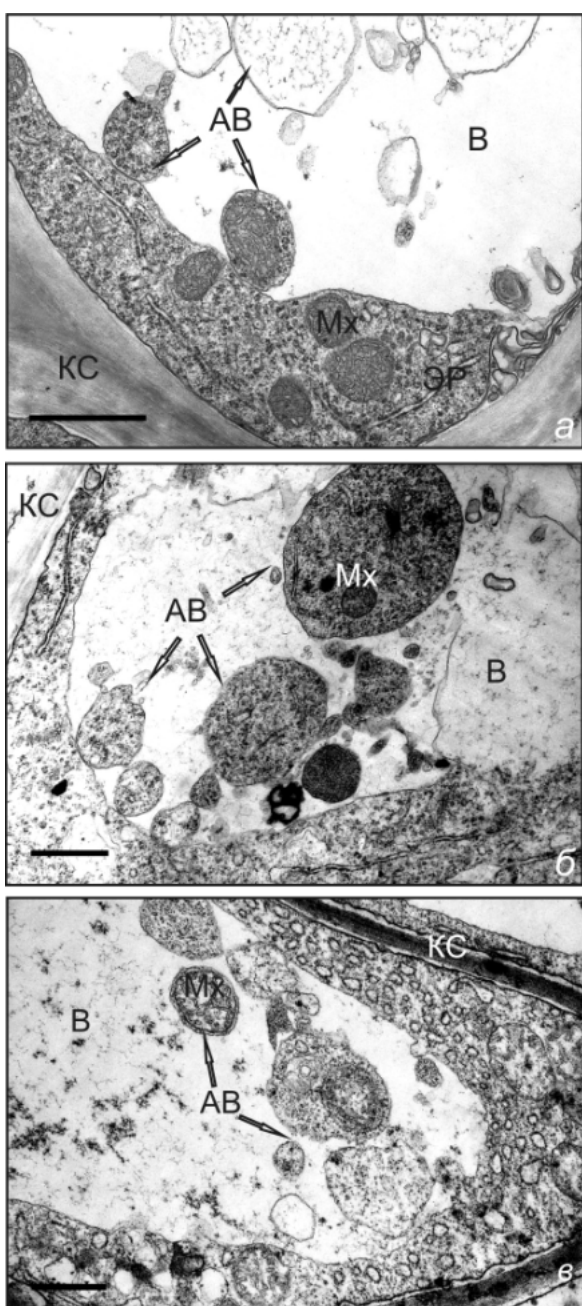
Рис. 1. Динамика поглощения кислорода отсеченными корнями пшеницы при 6-часовом действии параквата: А – отсеченные корни, Б - отсеченные корни без зоны роста.

Особенно ярко выраженный эффект окислительный стресс оказывает на митохондрии, приводя к резкому повышению интенсивности дыхания и снижению его эффективности, о чем свидетельствует накопление белков – разобщителей окисления и фосфорилирования (Taylor et al., 2005). В наших экспериментах воздействие на корни Пк в различных концентрациях вызывало увеличение потребления кислорода корнями (рис. 1). При действии Пк в концентрации 100 мкМ изначальное усиление потребления O_2 сменялось резким его падением после 3 ч инкубации (рис. 1 А). По данным электронной микроскопии, ни при одной из исследованных концентраций Пк в клетках не наблюдались конденсированные митохондрии, наличием которых можно было бы объяснить интенсификацию дыхания. Переход митохондрий в конденсированное состояние является следствием усиления дыхательной активности митохондрий, сопряженной с синтезом АТФ

(Машанский, Рабинович, 1987). Сопоставление интенсивности дыхания и ультраструктуры митохондрий позволило нам сделать заключение о том, что увеличение потребления кислорода при действии прооксидантов во многом связано с образованием АФК, а не усилением дыхательной активности митохондрий. Необходимо отметить, что поглощение кислорода корнями без зоны роста (меристемы + зоны растяжения) была значительно ниже таковой целых корней и не была чувствительна к действию Пк (рис. 1 Б). Мы полагаем, что существенный вклад в окислительно–восстановительные процессы при действии Пк вносят клетки растущей части корня.

В ходе Пк-индуцированного окислительного стресса ультраструктурные изменения затрагивали не все клетки ткани, однако большинство изменений, развиваясь гетерохронно, носили общий характер.

Рис. 2. Образование аутолитических вакуолей (АВ) в клетках корней пшеницы при действии параквата: а – 1 мкМ Пк; б – 10 мкМ Пк; в – 100 мкМ Пк. Стрелками указаны АВ. Масштабный отрезок - 1 мкм.



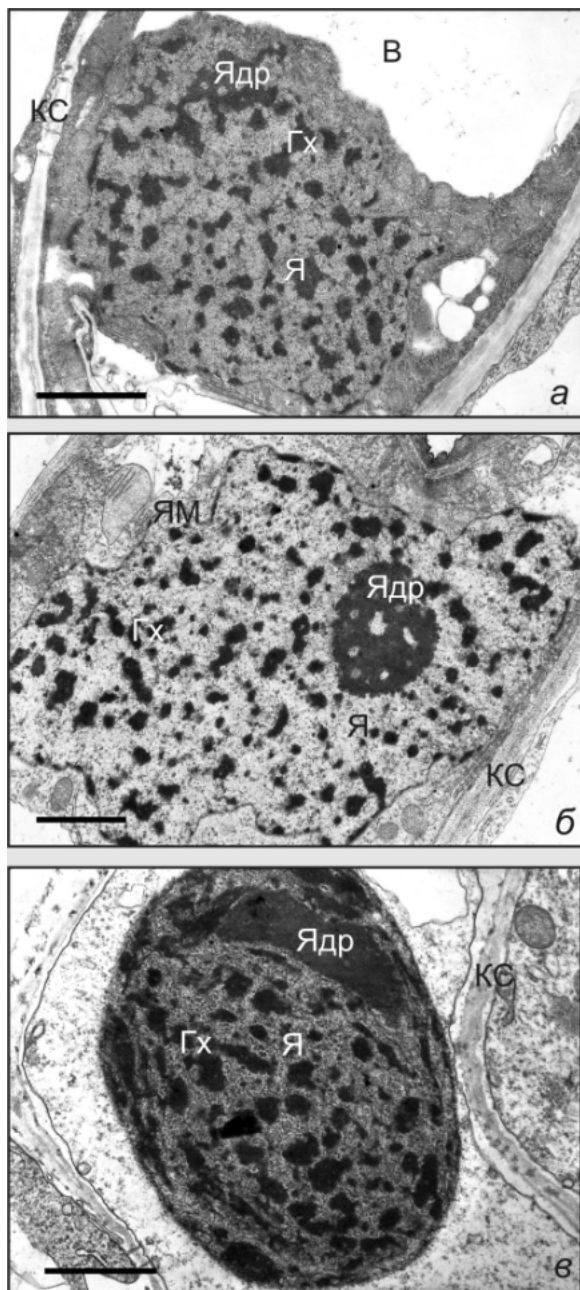


Рис. 3. Изменения морфологии ядер в клетках корней пшеницы при действии 1 мкМ параквата: а, б - извилистая форма ядра, конденсация хроматина, 1 и 5 ч соответственно, в – конденсация хроматина в ядре, 5 ч. Масштабный отрезок - 2 мкм.

Основные изменения структуры внутриклеточных органелл сводились к следующему: вакуолизации цитоплазмы, конденсации хроматина в ядре, расширению каналов эндоплазматического ретикулума, фрагментации тонопласта (данные представлены в диссертации), образованию аутолитических вакуолей, содержащих участки цитоплазмы и органеллы (рис. 2).

Пк в концентрации 1 мкМ в течение всего времени воздействия в части клеток вызывал необычные изменения в ядрах. При этом конденсация хроматина и форма ядер значительно отличались от таковых при действии Пк в концентрации 10 и 100 мкМ. Ядра приобретали неправильную лопатную форму, часть ядер характеризовалась необычной «текучей» конденсацией хроматина (рис. 3). Через 6 ч воздействия Пк наблюдался лизис большинства клеток, который сопровождался разрушением плазматической мембраны и диффузным

распределением клеточного содержимого по всему объему клетки. Пк-индуцированная гибель клеток была подтверждена в экспериментах по визуализации мертвых клеток окрашиванием красителем – Эвансом синим (табл. 3).

Таблица 3. Жизнеспособность клеток корней пшеницы после 6-часового воздействия Пк.

Варианты	Живые клетки, %
Контроль	99,1 ± 0,2
Пк (1 мкМ)	71,3 ± 11,1*
Пк (10 мкМ)	66,7 ± 10,1*
Пк (100 мкМ)	34,8 ± 11,2*

Наши данные свидетельствуют о несомненном вовлечении вакуоли и аутофагических механизмов в процессы гибели клеток растений при Пк-индуцированном окислительном стрессе. Образование аутолитических вакуолей, окруженных мембраной и содержащих фрагменты цитоплазмы и органеллы (рис. 2), происходит при программированной клеточной гибели (Ванюшин и др., 2000; Sarkar et al., 2004). Однако активация процессов аутофагии может происходить и при некротической гибели клеток, а также может играть роль стрессовой реакции, далеко не всегда ведущей к гибели клетки (Slavikova et al., 2005; Bassham et al., 2006; Xiong et al., 2007).

При действии Пк наиболее значительные изменения претерпевали структура и форма митохондрий. В зависимости от концентрации Пк мы наблюдали различные изменения в ультратонкой организации митохондрий. При действии 1 и 10 мкМ Пк большинство митохондрий после небольшого и временного просветления матрикса приобретали «С – образную» или кольцевую форму, а к 5-6 ч вновь имели ортодоксальный вид, сохраняя свою структуру даже в разрушенных клетках (данные представлены в диссертации). При действии 100 мкМ Пк в клетках корней наблюдали митохондрии с уменьшенным количеством крист и просветленным матриксом. Через 5 ч воздействия 100 мкМ Пк митохондрии имели сильно просветленный матрикс и лишь единичные кристы, что совпадает со снижением интенсивности дыхания (рис. 1 А) и, вероятно, свидетельствует о снижении окислительного фосфорилирования в митохондриях. Возрастание внутриклеточного уровня АФК, как известно, вызывает нарушение функций митохондрий, включая транспорт электронов и продукцию АТФ (Maxwell et al., 2002). Через 2 ч действия Пк в клетках наблюдалось значительное снижение митохондриального мембранного потенциала (рис. 4). Мы полагаем, что гибель клеток при действии Пк в высокой (100 мкМ) концентрации, по-видимому, обусловлена резким нарушением энергетических процессов, вследствие нарушения ультраструктуры митохондрий и падения синтеза АТФ. Гибель клеток при обработке корней Пк в более низких концентрациях (1 и 10 мкМ), вероятно,

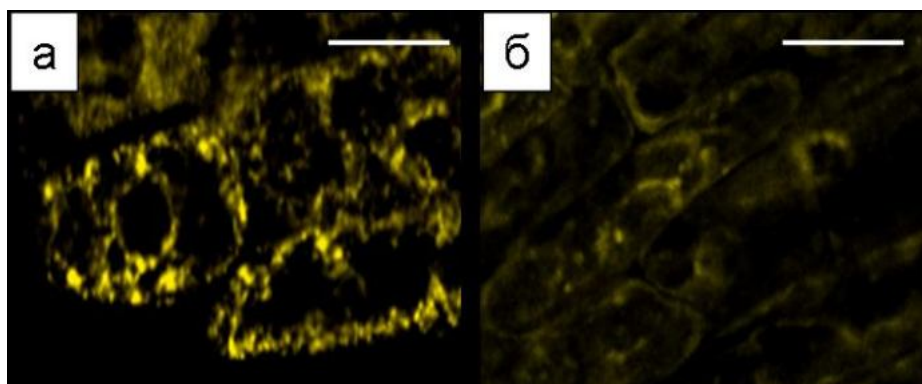


Рис. 4. Митохондриальный мембранный потенциал корней пшеницы, оцененный по интенсивности флуоресценции тетраметилпродамина, после 2 ч действия Пк: а – контроль, б – 1 мкМ Пк. Масштабный отрезок - 20 мкм.

обусловлена неэффективной работой митохондрий и недостаточностью энергоснабжения, несмотря на сохраняющуюся структуру митохондрий.

Таким образом, изменения в ионной проницаемости плазмалеммы, изменения структуры митохондрий, падение мембранного потенциала митохондрий позволяют нам предполагать, что Пк-индуцированная преждевременная гибель клеток происходит вследствие недостаточности энергетических ресурсов.

3.2. АФК- и H^+ -опосредованное действие салициловой кислоты на рост и ультраструктуру клеток

Естественным прооксидантом, вовлеченным в гормональную сигнализацию, контроль роста и пролиферации, как известно, является растительный гормон салициловая кислота (СК). СК способствует усилению образования АФК и может приводить к развитию окислительного стресса. Действительно, инкубация корней с СК приводила к увеличению содержания H_2O_2 и повышению уровня ПОЛ (табл. 4).

Таблица 4. Изменения содержания H_2O_2 и уровня ПОЛ при инкубации корней пшеницы в течение 6 ч в растворах СК.

Варианты	Параметры	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	7,1 ± 1,0	8,9 ± 1,6	9,5 ± 0,3
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1	1,9 ± 0,7
	ПОЛ, %	112 ± 19	94 ± 15	99 ± 17
СК (0,01 мМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	9,3 ± 0,9	13,4 ± 0,7	16,1 ± 1,0
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	1,7 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,6
	ПОЛ, %	102 ± 16	117 ± 10	129 ± 14
СК (0,1 мМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	10,1 ± 0,4	14,0 ± 0,9	15,8 ± 0,8
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	1,4 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,1
	ПОЛ, %	111 ± 8	121 ± 19	144 ± 17
СК (1 мМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	9,1 ± 0,8	14,8 ± 0,6	27,1 ± 1,0
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	3,1 ± 0,2	4,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2
	ПОЛ, %	124 ± 9	140 ± 12	153 ± 8

Примечание: ^а – содержание H_2O_2 в растворимой фракции гомогената, ^б – содержание H_2O_2 в растворе инкубации.

Кроме того, СК вызвала подавление митотической активности корневых клеток (табл. 5) и роста корней. Можно полагать, что обнаруженное в наших экспериментах СК-индуцированное ингибирование деления клеток и роста корней может быть обусловлено развитием в них окислительного стресса. Однако разнообразие эффектов СК на физиологические функции организмов обусловлено не только АФК-опосредованными механизмами, но также и ее протонофорными свойствами. Известно, что экзогенная СК переносит протоны в клетку, что приводит к закислению цитоплазмы и изменениям в энергетическом метаболизме (Скулачев, 1969). Увеличение в клетке содержания протонов (подкисление цитоплазмы) является одной из причин ингибирования синтеза ДНК и пролиферации клеток (Гордон и др., 2002).

Таблица 5. Изменение митотической активности в клетках корневой меристемы пшеницы при 6 ч инкубации корней в растворах СК, СССР, 2,4-ДНФ, карнозина и Tris-HCl буфера.

Варианты	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	4,5 ± 0,4	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,2
СК (1 мМ)	3,7 ± 0,9	1,4 ± 0,7*	1,7 ± 0,6*
Карнозин (20 мМ)	4,3 ± 0,2	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,5
СК + Карнозин	4,3 ± 0,3	3,7 ± 0,9	3,9 ± 0,8
СК + Tris-HCl буфер (10 мМ)	4,6 ± 0,5	3,6 ± 0,8	3,3 ± 0,2*
Контроль	4,3 ± 0,3	3,9 ± 0,7	4,1 ± 0,1
2,4-ДНФ (0,1 мМ)	3,7 ± 0,6	1,9 ± 0,7*	0,6 ± 0,5*
2,4-ДНФ + Карнозин	4,7 ± 0,2	3,6 ± 0,8	3,4 ± 0,3*
2,4-ДНФ + Tris-HCl буфер	4,4 ± 0,1	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,3*
Контроль	4,5 ± 0,3	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,4
СССР (50 мкМ)	3,4 ± 1,0*	1,9 ± 0,6*	1,2 ± 0,2*
СССР + Карнозин	3,5 ± 1,0*	3,7 ± 0,7	3,2 ± 0,6*
СССР + Tris-HCl -буфер	4,1 ± 0,5	3,9 ± 0,6	3,6 ± 2,1

Для подтверждения предположения о протон-опосредованных механизмах действия СК на деление клеток нами были проведены эксперименты с использованием классических протонифоров и соединений, обладающих протонной буферной способностью. Предотвращение сдвигов протонного градиента при инкубировании корней с добавлением 20 мМ карнозина или 10 мМ Tris-HCl буфера (рН 7.0) приводило к нивелированию ингибирующего эффекта СК, СССР и 2,4-ДНФ (табл. 5). Таким образом, эффекты СК на растительные клетки обусловлены сложным комплексом реакций, зависящих от ее прооксидантных и протонифорных свойств.

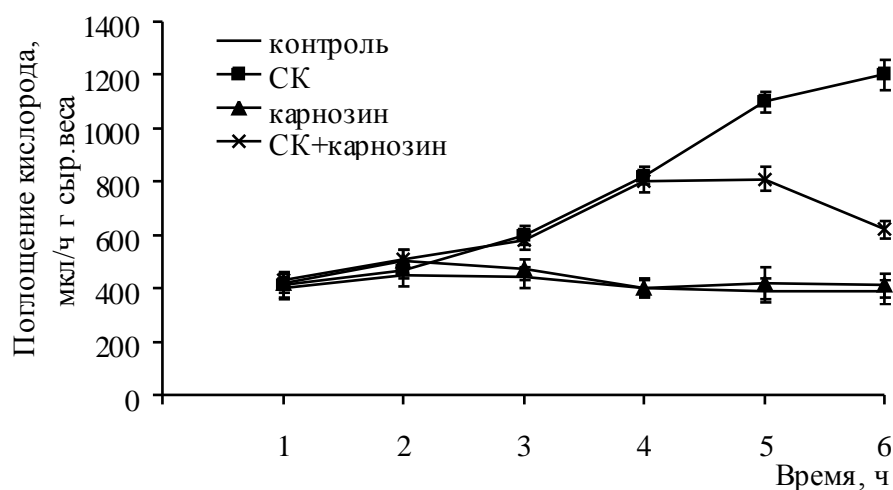


Рис. 5. Поглощение кислорода клетками отсеченных корней пшеницы при 6 ч действия СК и карнозина.

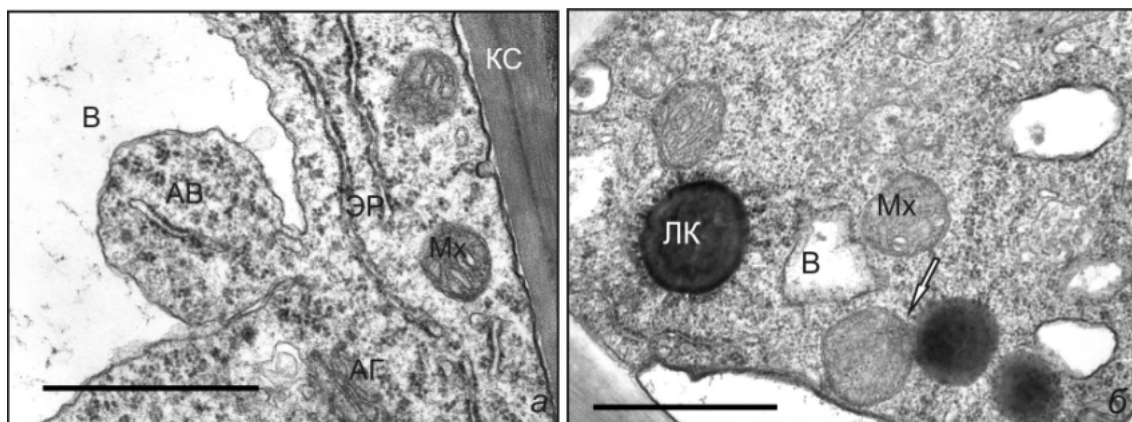


Рис. 6. Изменения ультраструктуры клеток корней пшеницы при действии 1 мМ СК: а – конденсированные митохондрии, образование аутолитических вакуолей, 1 ч; б – образование небольших вакуолей в цитоплазме, митохондрии, контакт митохондрий с липидными каплями (стрелка), 4 ч. Масштабный отрезок - 1 мкм.

Накопление АФК и сдвиги протонного градиента на мембранах, вероятно, приводят к ингибированию деления клеток при действии СК. Кроме того, смещение протонного гомеостаза при действии СК может приводить к активации редокс-систем на поверхности и внутри клетки и, тем самым, способствовать усилению генерации АФК.

Ранее было показано, что эффекты СК на дыхательную активность и теплопродукцию корней пшеницы во многом определяются ее протонофорными свойствами (Гордон и др., 2002; Gordon et al., 2004). В наших экспериментах 1 мМ СК вызвала значительное усиление потребления кислорода после 4 ч воздействия (рис. 5), которое предотвращалось при совместном действии СК и карнозина (рис. 5).

Для выяснения того, может ли СК при воздействии на клетки корней действовать как классический разобщитель окисления и фосфорилирования, нами были проведены ультраструктурные и гистохимические исследования митохондрий. Через 2-3 ч воздействия 1 мМ СК часть митохондрий на поперечном срезе приобретала

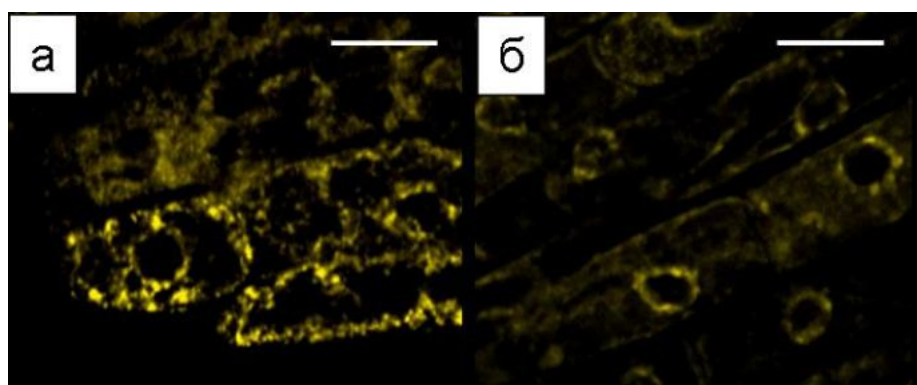


Рис. 7. Митохондриальный мембранный потенциал корней пшеницы, оцененный по интенсивности флуоресценции тетраметилпродамина, после 2 ч действия СК: а – контроль, б – 1 мМ СК. Масштабный отрезок - 20 мкм.

тороидальный (кольцевой) вид. В клетках наблюдались также контакты митохондрий с липидными каплями (рис. 6 б). После 4 ч количество тороидальных митохондрий значительно уменьшалось, и большинство митохондрий имело ортодоксальный вид с небольшим просветлением матрикса. При действии на клетки классических разобщителей митохондрии характеризуются редукцией крист, значительным просветлением матрикса, увеличением размера (Пономарева и др., 2004; Пономарева и др., 2006). Таким образом, исследование ультраструктуры митохондрий показало, что действие СК отличается от действия классических разобщителей. Однако через 2 ч действия СК в клетках происходило значительное снижение митохондриального мембранного потенциала, выявленного по уменьшению интенсивности флуоресценции тетраметилродамина - красителя, накапливающегося в энергизованных митохондриях (рис. 7). Можно полагать, что СК, как и многие прооксиданты (Taylor et al., 2005), приводит к мягкому разобщению окисления и фосфорилирования в митохондриях.

Помимо изменений в структуре митохондрий, наблюдали изменения и в других органеллах: происходила конденсация хроматина в ядре, образование пероксисом, расширение каналов шероховатого ЭПР. Кроме того, уже после 1 ч воздействия СК на корни наблюдалось образование большого количества аутолитических вакуолей, содержащих участки цитоплазмы и различные органеллы (рис. 6 а). Аутолитические вакуоли характерны для стареющих клеток растений и клеток, испытывающих недостаток питательных веществ (Slavikova et al., 2005). Согласно существующим в литературе представлениям, образование подобных вакуолей характерно для процесса аутофагии, который в настоящее время относят к одному из видов ПКС (Contento et al., 2005). Таким образом, воздействие на клетки двух исследованных нами прооксидантов (Пк и СК) приводило к усилению образования аутолитических вакуолей.

Обнаружено также, что подобно действию Пк, 6-часовая инкубация корней с СК вызывала гибель части клеток, которая сопровождалась массовой усиленной вакуолизацией цитоплазмы клеток, разрывами тонопласта, усиленным образованием аутолитических вакуолей, содержащих участки цитоплазмы и органеллы, полной деструкцией внутриклеточной организации (данные представлены в диссертации). При окрашивании клеток красителем Эвансом синим, который проникает только в мертвые клетки, было обнаружено, что после 6 ч воздействия СК окрашивается около 40% клеток корня (табл. 6). При совместном действии СК и карнозина процент мертвых клеток снижался (табл. 6).

Мы предполагаем, что причиной гибели клеток в условиях СК-индуцированного окислительного стресса, как и при Пк-индуцированной гибели, является нарушение энергетического гомеостаза. Подавление синтеза АТФ при действии СК показано для клеток табака (Xio et al., 1999). Наши предположения о

Таблица 6. Жизнеспособность клеток корней пшеницы после 6-часового воздействия СК и карнозина.

Варианты	Живые клетки, %
Контроль	97,3 ± 0,7
СК (1 мМ)	59,2 ± 14,7*
Карнозин (20 мМ)	95,5 ± 1,65
СК + карнозин	77,7 ± 6,57*

снижении энергообеспечения клеток основываются на данных электронно-микроскопического исследования и снижении митохондриального мембранного потенциала. Выявленные контакты митохондрий с липидными каплями (рис. 6 б) подтверждают, что в клетках происходит недостаток энергоресурсов, и они используют липиды в качестве альтернативного энергетического субстрата. Дефицит энергии также может возникать вследствие необходимости восстановления нарушенного ионного градиента на плазмалемме и защиты клеток от окислительного стресса. Снижение роста корней, митотической активности клеток, разрушение внутриклеточной организации и гибель части клеток корней пшеницы при действии СК обусловлены увеличением ионной проницаемости плазмалеммы, нарушением функционирования митохондрий, развитием окислительного стресса, и в конечном итоге, нарушением энергообеспечения клеток.

3.3. Структурно-функциональные изменения клеток корней пшеницы при действии ионов Li^+

Для индукции окислительного стресса часто используются не только специфические прооксиданты, но также и другие соединения, обладающие способностью индуцировать образование АФК. Ионы лития относятся к редокс-неактивным соединениям, которые могут приводить к активации свободно-радикальных реакций с участием АФК за счет нарушения динамического равновесия в системе про- и антиоксиданты (Kietczykowska et al., 2004). В наших экспериментах обработка корней пшеницы 10 мМ LiCl приводила к усилению продукции супероксидного анион-радикала более чем в два раза по сравнению с контролем (данные представлены в диссертации), а также к увеличению содержания в клетках H_2O_2 (табл. 7) и усилению процессов ПОЛ (табл. 7). Это свидетельствует о развитии в клетках окислительного стресса.

Однако эффекты Li^+ на растения могут быть обусловлены не только развитием в клетках окислительного стресса. Наиболее широко распространенной гипотезой для объяснения эффектов ионов лития, является «гипотеза инозитольного истощения» (Berridge, 1993), которая основана на ингибировании литием инозитольного цикла, участвующего в регуляции деления клеток (Красильников, 2000; Ercetin, Gillaspay, 2002). В наших экспериментах 6 ч инкубация корней пшеницы в присутствии 10 мМ LiCl вызвала снижение митотической активности меристематических клеток (данные

Таблица 7. Изменения содержания H_2O_2 и уровня ПОЛ при 6 ч действии на корни пшеницы LiCl и миоинозитола.

Варианты	Параметры	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	15,4 ± 0,8	17,3 ± 1,2	12,4 ± 0,7
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	ПОЛ, %	107 ± 9	112 ± 12	116 ± 13
LiCl (10 мМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	19,1 ± 0,6	29,7 ± 0,9	28,7 ± 1,4
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	3,7 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,4
	ПОЛ, %	123 ± 11	156 ± 7	143 ± 9
Миоинозитол (15 мМ)	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	6,5 ± 0,7	16,8 ± 0,4	13,9 ± 0,6
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	1,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1
	ПОЛ, %	111 ± 7	112 ± 5	129 ± 7
LiCl + миоинозитол	H_2O_2 , (10^{-6} М) ^а	16,0 ± 0,6	19,1 ± 0,5	21,2 ± 0,8
	H_2O_2 , (10^{-7} М) ^б	3,9 ± 0,4	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,4
	ПОЛ, %	120 ± 13	131 ± 7	134 ± 6

Примечание: ^а – содержание H_2O_2 в растворимой фракции гомогената, ^б – содержание H_2O_2 в растворе инкубации.

представлены в диссертации). Выращивание проростков на 10 мМ LiCl в течение 5 суток приводило к значительному ингибированию деления корневых клеток и роста корней (табл. 8). Снятие миоинозитолом ингибирующего влияния Li^+ на митотическую активность свидетельствует об участии инозитольного цикла в регуляции процессов деления клеток. Кроме того, миоинозитол предотвращал Li^+ -индуцированную стимуляцию образования АФК (табл. 7). Возможно, в наших экспериментах снятие вызванных Li^+ негативных эффектов на деление меристематических клеток обусловлено антиоксидантными свойствами миоинозитола. Выращивание проростков на растворе миоинозитола в течение 5 суток способствовало стимуляции роста корней и увеличению митотической активности корневых клеток (табл. 8).

Следует, однако, заметить, что увеличенная митотическая активность сопровождалась возникновением в клетках хромосомных aberrаций (табл. 8). Одной из причин инозитол-индуцированного появления хромосомных aberrаций может

Таблица 8. Влияние LiCl, CaCl₂ и миоинозитола на длину корней, митотическую активность (МИ) и частоту возникновения хромосомных aberrаций (АА) в клетках корневой меристемы пшеницы при выращивании проростков в течение 5 суток.

Варианты	Длина, мм	МИ, %	АА, %
Контроль	66 ± 11	5,1 ± 0,9	2,77
LiCl (10 мМ)	36 ± 9*	2,9 ± 0,2*	0
Инозитол (15 мМ)	74 ± 15*	6,7 ± 1,5*	12,36*
LiCl + инозитол	60 ± 11	4,8 ± 0,8	6,78
Контроль	64 ± 14	4,6 ± 0,7	2,4
CaCl ₂ (10 мМ)	61 ± 12	4,5 ± 0,8	13,9*

быть избыток накопления в цитоплазме ионов кальция (Scott et al., 1991). Как известно, функционирование инозитольного цикла сопровождается увеличением концентрации ионов кальция в цитозоле за счет их выхода из внутриклеточного депо – вакуоли, эндоплазматического ретикулума, митохондрий (Blume et al., 2000). Это предположение подтвердилось в экспериментах, в которых выращивание проростков на 10 мМ CaCl_2 приводило к увеличению количества клеток с хромосомными aberrациями (табл. 8). Таким образом, несмотря на то, что Ca^{2+} является необходимым элементом для прохождения митотического цикла (Whitaker, 1997), избыточная аккумуляция Ca^{2+} , возникающая либо в результате выхода его из внутриклеточных депо при активации инозитольного цикла, либо в результате его увеличенного поступления из внешней среды по Ca^{2+} -каналам, может приводить к возникновению хромосомных aberrаций. Наши данные по изучению влияния модуляторов инозитольного цикла и Ca^{2+} на клетки корней пшеницы подтвердили данные, полученные нами для клеток корней гороха (данные представлены в диссертации), показав универсальность механизмов по действию Ca^{2+} для клеток различных семейств растений и подтвердив Ca – зависимую работу инозитольного цикла в клетках растений.

Эффекты ионов Li^+ , однако, могут быть обусловлены как блокадой фосфоинозитольного цикла, так и индуцированием Li^+ в клетках окислительного стресса. Известно, что токсическое действие ионов Li^+ на клетки млекопитающих и человека сопровождается усилением процессов ПОЛ, ингибированием дыхания и разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях (Филова и др., 1988; Pizarro et al., 2008).

Воздействие 10 мМ LiCl в наших экспериментах привело к стимуляции поглощения кислорода в течение всех 6 часов инкубации (рис. 8). Возможно, что

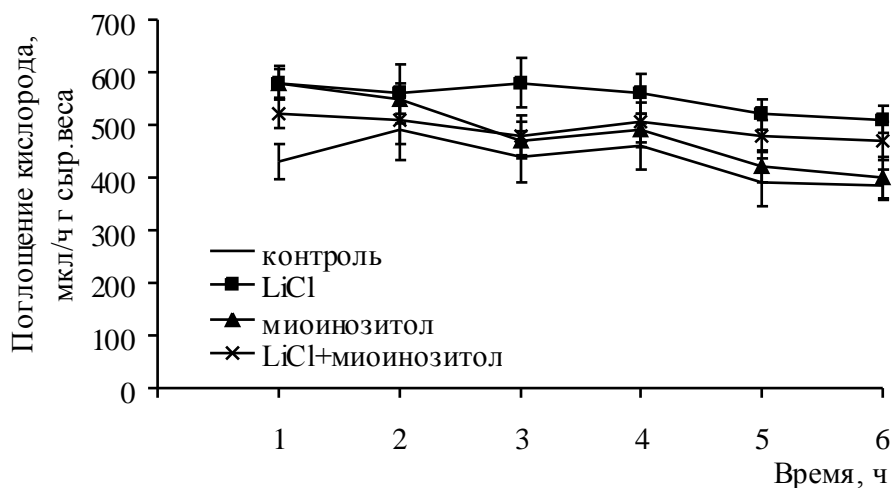


Рис. 8. Поглощение кислорода клетками отсеченных корней пшеницы при действии LiCl и миоинозитола.

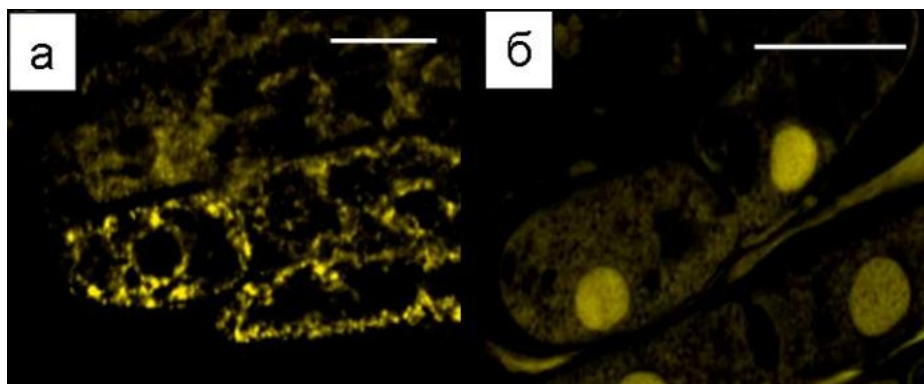
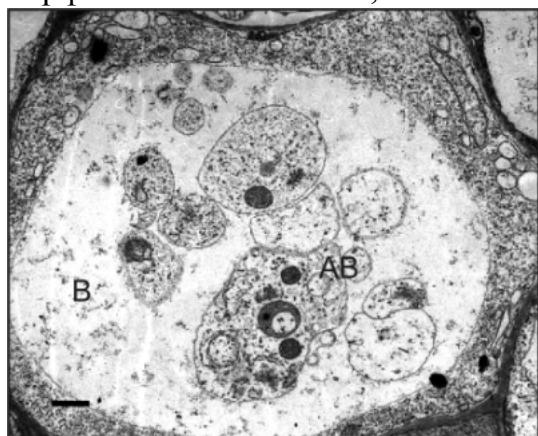


Рис. 9. Митохондриальный мембранный потенциал корней пшеницы, оцененный по интенсивности флуоресценции тетраметилродамина, после 2 ч действия LiCl: а – контроль, б – 10 мМ LiCl. Масштабный отрезок - 20 мкм.

причиной стимуляции поглощения кислорода корнями пшеницы при действии на корни Li^+ , также как при действии других исследованных нами прооксидантов (Пк, СК), может быть окислительный стресс и усиленное восстановление кислорода, связанное с образованием АФК, а не усиление дыхательной активности митохондрий. Это подтверждается отсутствием в клетках конденсированных митохондрий (данные представлены в диссертации) и значительным снижением митохондриального мембранного потенциала (рис. 9). Таким образом, вероятно, одним из механизмов токсического действия ионов Li на растительные клетки является снижение окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Воздействие ионов Li^+ на корни приводило к изменениям ультраструктуры всех клеточных органелл. После 1 ч инкубации в клетках наблюдалось образование аутолитических вакуолей, содержащих куски цитоплазмы и органеллы (рис. 10). Кроме того, наблюдалось увеличение количества пероксисом, что соответствует усиленному образованию АФК. При 6 ч действии Li^+ происходила гибель части клеток (табл. 9). Таким образом, наши данные подтверждают имеющиеся в литературе (Sarkar, Rubinsztein, 2006) сведения о том, что гибель клеток при действии ионов лития происходит по пути аутофагии. Миоинозитол приводил к нивелированию негативных эффектов ионов Li^+ на ультраструктуру и жизнеспособность клеток (табл. 9). В наших экспериментах при совместном действии ионов Li^+ и миоинозитола наблюдалось уменьшение количества разрушенных клеток; большинство клеток сохраняло нормальное строение без существенных изменений морфологии. Возможно, что снятие миоинозитолом, вызванных Li^+ , негативных



эффектов на структуру внутриклеточных органелл и жизнеспособность клеток, обусловлено его антиоксидантным действием (табл. 7).

Рис. 10. Изменения ультраструктуры клеток корней пшеницы при действии 10 мМ LiCl: аутолитические вакуоли в центральной вакуоли клетки, 3 ч. Масштабный отрезок - 1 мкм.

Таблица 9. Жизнеспособность клеток корней пшеницы после 6-часового воздействия LiCl и миоинозитола.

Варианты	Живые клетки, %
Контроль	99,1 ± 0,1
LiCl (10 мМ)	35,4 ± 9,7*
Миоинозитол (15 мМ)	94,3 ± 0,5
LiCl + миоинозитол	81,6 ± 2,9

Данные наших экспериментов свидетельствуют о том, торможение роста корней, деления клеток и гибель части клеток при воздействии ионов лития, по всей вероятности, связано с развитием в клетках окислительного стресса и подавлением функционирования инозитольного цикла. Это находит свое подтверждение в Li⁺-индуцированном избыточном накоплении АФК и продуктов ПОЛ, а также снятии негативных эффектов лития при воздействии миоинозитола путем активации инозитольного цикла и усиления кальциевой сигнализации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование структурно-функциональных изменений в клетках корней пшеницы при действии веществ, различающихся по строению и механизмам действия, однако приводящим к развитию в клетках окислительного стресса, показало, что ответная реакция клеток в большинстве случаев универсальна. Накопление АФК в клетках при действии прооксидантов (СК, Пк, Li⁺), приводило к подавлению митотической активности клеток, снижению роста корней, изменению ионной проницаемости плазмалеммы, стимуляции поглощения кислорода.

Можно полагать, что ответные реакции клеток на действие прооксидантов обусловлены не только накоплением АФК, но и другими причинами. Изменения митотической активности и ионного гомеостаза клеток при действии СК во многом определяются ее протонофорными свойствами, что подтверждается частичным снятием негативных эффектов при использовании буферных соединений. Торможение роста корней, деления клеток и гибель части клеток при воздействии ионов лития, наряду с развитием в клетках окислительного стресса, по всей вероятности, связаны с подавлением функционирования инозитольного цикла. Это находит свое подтверждение в снятии негативных эффектов лития на рост, деление клеток при воздействии миоинозитола путем активации инозитольного цикла и усиления кальциевой сигнализации.

Наиболее значительными ультраструктурными изменениями в условиях окислительного стресса были изменения в структуре митохондрий. Так, в условиях жесткого окислительного стресса наблюдалось их набухание, просветление матрикса и редукция крист. При более слабом окислительном стрессе митохондрии впоследствии восстанавливали свою структуру. Сопоставление интенсивности

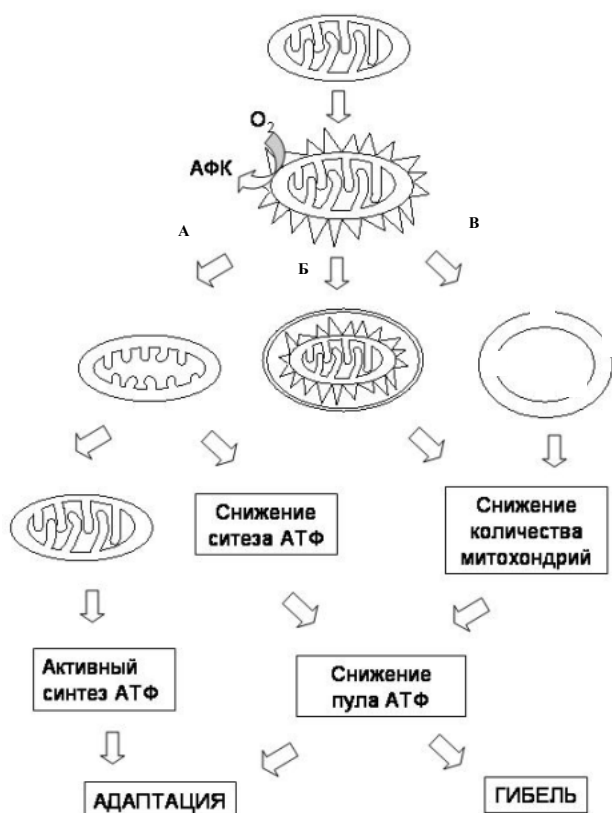


Рис. 10. Схематическое изображение возможных механизмов функционирования митохондрий в условиях окислительного стресса: А – разобщение окисления и фосфорилирования; Б – удаление митохондрии при помощи аутолитических процессов; В – разрушение митохондриальных мембран.

дыхания и ультраструктуры митохондрий позволило нам сделать заключение о том, что увеличение потребления кислорода при действии прооксидантов во многом связано с образованием АФК, а не усилением дыхательной активности митохондрий.

Можно полагать, что в условиях окислительного стресса в растительных клетках возрастают затраты энергии на

поддержание гомеостаза и возникает дефицит энергии на рост (Семихатова, 1995). Нарушение энергообеспечения клеток может достигаться совокупностью механизмов; значительную роль в энергетическом дисбалансе при окислительном стрессе играет нарушение функционирования митохондрий.

На рис. 10 представлены возможные механизмы функционирования митохондрий, как основной АФК-генерирующей внутриклеточной структуры в условиях окислительного стресса. Усиленное образование АФК может приводить к повреждению митохондриальных мембран через перекисное окисление липидов и разрушению митохондрий (рис. 10, В). Однако усиление в митохондриях генерации АФК может являться сигналом для устранения «опасных» митохондрий - в клетке включаются процессы аутолитической деградации этих органелл в вакуолях (рис. 10, Б). При этих сценариях развития событий происходит количественное снижение популяции митохондрий, что неизбежно ведет к снижению общего пула АТФ и может приводить к гибели клетки. Кроме того, известно, что в ответ на сверхпродукцию АФК в митохондриях включаются механизмы разобщения окисления и фосфорилирования для снижения уровня АФК (рис. 10, А), в результате чего нарушаются процессы синтеза АТФ и уменьшается общий пул АТФ. Это подтверждается нашими данными по снижению митохондриального потенциала при действии прооксидантов. Развитие в клетках окислительного стресса приводит к деструктивным процессам в клетке, необходимости их репарации и, вследствие недостаточности энергетических ресурсов для адаптации, к преждевременной гибели

клеток. Однако известно, что гибель клетки не является обязательным финальным этапом при развитии окислительного стресса. Если клетка с помощью различных физиологических процессов справится со сверхпродукцией АФК, а повреждения клетки, не являясь летальными, будут репарированы, клетка адаптируется к действию стрессора и после необходимого для восстановления своих структур времени вернется к нормальному функционированию.

Таким образом, наши и литературные данные свидетельствуют о возникновении энергетического дисбаланса в растительных клетках при действии прооксидантов. Гибель клеток в условиях окислительного стресса, по-видимому, обусловлена нарушением энергетических процессов за счет снижения синтеза АТФ и уменьшения общего пула АТФ вследствие разрушения структуры и функций митохондрий и/или неэффективной работы митохондрий. Кроме того, нарушение энергообеспечения, приводящее к нарушениям процессов роста и развития, может достигаться совокупностью механизмов, в том числе усилением энергозависимых процессов для детоксикации АФК и прооксидантов, активацией синтеза защитных соединений, в том числе антиоксидантов, восстановлением нарушенных ионных градиентов на мембранах.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие прооксидантов на клетки корней пшеницы характеризуется быстрой и устойчивой продукцией перекиси водорода и нарастанием процессов перекисного окисления липидов.
2. Окислительный стресс под влиянием прооксидантов (ПК, СК, Li^+) приводит к увеличению проницаемости плазмалеммы для K^+ и H^+ , стимуляции потребления O_2 , не сопровождающейся усилением дыхательной активности митохондрий. Об этом свидетельствует уменьшение митохондриального мембранного потенциала, изменение ультратонкой организации митохондрий.
3. В условиях окислительного стресса в клетках происходит интенсивное образование аутолитических вакуолей, содержащих участки цитоплазмы, митохондрии и другие органеллы. Это объясняется необходимостью удаления поврежденных АФК структур и окисленных макромолекул.
4. Обнаружено, что подавление митотической активности клеток под действием салициловой кислоты обусловлено ее прооксидантными и протонофорными свойствами.
5. Торможение роста корней, деления клеток и гибель части клеток при воздействии ионов лития обусловлены развитием в клетках окислительного стресса и подавлением функционирования инозитольного цикла.
6. В условиях окислительного стресса энергетический кризис, обусловленный нарушением функционирования митохондрий, усилением расхода энергии на процессы детоксикации АФК и прооксидантов и восстановлением нарушенных ионных градиентов на мембранах, вызывает подавление деления, замедление роста и преждевременную гибель части клеток.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изменения митотической активности при увеличении протонной проницаемости корневых клеток пшеницы / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // IV международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений».- Минск, 2005.- С.73.
2. **Дмитриева, С.А.** Митотический индекс меристематических клеток и рост корней гороха *Pisum sativum* при действии модуляторов инозитольного цикла / **С.А. Дмитриева**, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Цитология.- 2006.- Т.48, №6.- С.475-479.
3. Структурно - функциональные изменения клеток корней пшеницы при действии параквата / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Л.Х. Гордон, Ф.В. Минибаева // Всероссийская конференция молодых ученых и II школа им. академика Н.М. Эммануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты».- Москва, 2006.- С. 166-167.
4. Функциональная активность клеток корней пшеницы при действии салициловой кислоты / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон, Д.Ф. Рахматуллина // Международный симпозиум «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете».- Казань, 2006.- С. 170-171.
5. Индуцированное старение и гибель клеток при окислительном стрессе в корнях пшеницы / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Доклады РАН.- 2007. - Т. 414, № 1. - С. 133-136.
6. Характеристика ультраструктурных изменений в клетках корней пшеницы при индукции окислительного стресса паракватом / А.А. Пономарева, **С.А. Дмитриева**, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Материалы всероссийской конференции «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды».- Иркутск, 2007. - С. 203-206.
7. Изменения в клетках корней пшеницы при индукции окислительного стресса метилвиологеном / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» VI Съезда общества физиологов растений России.- Сыктывкар, 2007.- Т. 2.- С. 115-116.
8. Cell proliferation and ultrastructure in the roots of young wheat seedlings induced by oxidative stress. / **S. Dmitrieva**, F. Minibayeva, A. Ponomareva, L. Gordon // Abstr. International conference «Desiccation Tolerance of Plants»:, South African Journal of Botany.- South Africa, 2007.- Vol. 73, №3.- P. 499.
9. Oxidative stress induces autophagy-like cell death in *Triticum aestivum* roots / F. Minibayeva, **S. Dmitrieva**, A. Ponomareva, L. Gordon // Abstr. International conference «SFRR Plant Oxygen Group meeting».- Gent, Belgium, 2007.- P. 121.
10. Изменения в клетках корней пшеницы при индукции окислительного стресса ионами лития / А.А. Пономарева, **С.А. Дмитриева**, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // IV съезд «Российского общества биохимиков и молекулярных биологов».- Новосибирск, 2008.- С. 172.
11. Изменения в клетках корней пшеницы при действии салициловой кислоты / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // IV съезд «Российского общества биохимиков и молекулярных биологов».- Новосибирск, 2008.- С. 164.
12. Салицилат-индуцированное увеличение протонной проницаемости плазмалеммы: энергетический метаболизм, рост и ультраструктура растительных клеток / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Международная научная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений».- Екатеринбург, 2008.-С. 158-159.
13. **Дмитриева, С.А.** Морфология повреждений растительных клеток при активации перекисного окисления липидов / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева // Международный симпозиум «Липиды и оксипирины растений».- Казань, 2008. – С. 55.
14. АФК- и протон-опосредованное действие салициловой кислоты на рост и ультраструктуру клеток корней / **С.А. Дмитриева**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Ученые Записки Казанского Университета.- 2008. (принята к печати).