

ПРОТОНОФОРЫ КАК ИНДУКТОРЫ ЭНЕРГОЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

© **О. О. Полыгалова**, **А. А. Пономарева**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
электронный адрес: na.ponomareva@mail.ru

Исследовали мембранный потенциал на плазмалемме, выход ионов K^+ в инкубационную среду, дыхательный газообмен, содержание АТФ и изменения ультраструктуры в клетках отсеченных корней проростков пшеницы при действии протонифоров 2,4-DNP (2,4-dinitrophenol) и CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone). Через 1—4 ч воздействия протонифоров происходили падение мембранного потенциала плазмалеммы, выход ионов K^+ в инкубационный раствор и ингибирование интенсивности поглощения кислорода клетками. Митохондрии имели овальную форму, многочисленные четко очерченные и слегка набухшие кристы, что соответствует конденсированному типу органелл. Также при воздействии протонифоров было обнаружено своеобразное пространственное расположение крист в митохондриях (стопками параллельно друг другу, а также веерообразно и в виде пропеллеров). Через 5 ч воздействия протонифоров на фоне значительной стимуляции поглощения кислорода, низкого мембранного потенциала и снижения функциональной активности митохондрий начиналось разрушение ультраструктуры клеток. Предполагается, что выявленные конформационные переходы митохондрий отражают постепенные изменения их функциональной активности и физиологического состояния клеток при длительном воздействии протонифоров.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., протонифоры, ультраструктура, митохондрии, кристы.

Принятые сокращения: 2, 4-DNP — 2, 4-dinitrophenol; CCCP — carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone.

При любом внешнем воздействии на растительную клетку наблюдается целый ряд неспецифических ответных реакций (Тарчевский, 2001), в том числе падение мембранного потенциала на плазматической мембране, выход ионов K^+ в инкубационную среду и поступление протонов в клетку. Для нормального протекания метаболических процессов в клетке должен поддерживаться ионный гомеостаз, который в стрессовых условиях регулируется работой различных каналов и АТФаз, при этом исключительную роль играет регуляция рН цитоплазмы. При смещении значения рН цитоплазмы в более кислую область происходит интенсификация энергетического метаболизма (Косых, Ченцов, 1992). Так как одним из основных источников АТФ в нефотосинтезирующих клетках являются митохондрии, при внешнем воздействии на клетку должно наблюдаться усиление окислительного фосфорилирования.

Поскольку ключевую роль в процессе окислительно-го фосфорилирования в митохондриях играет трансмембранный градиент H^+ , можно предположить существование механизмов, позволяющих митохондриям вырабатывать АТФ при разной степени подкисления цитоплазмы. Протонифоры являются классическим инструментом для изучения процессов сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях. Однако ранее нами было показано (Полыгалова и др., 1991; Пономарева, Полыгалова, 2001), что протонифоры (50 мкМ 2, 4-DNP и 0.5 мкМ

СССР) воздействовали преимущественно на плазмалемму клеток корней пшеницы и направленно смещали значения рН цитоплазмы в более кислую область. При этом регистрировали деполяризацию плазмалеммы клеток, небольшую стимуляцию дыхания и конденсированную структуру митохондрий, что свидетельствует об активно протекающих в них реакциях окислительного фосфорилирования. Через 5—6 ч инкубации с протонифорами клетки корней адаптировались к данным воздействиям.

Целью работы было выявить характерные структурно-функциональные изменения, происходящие при длительном воздействии протонифоров на целые растительные клетки, и охарактеризовать последовательность изменений ультраструктуры митохондрий при значительном подкислении цитоплазмы и нарушении энергообеспечения.

Материал и методика

Объектом исследования служили корни 5—6-суточных проростков яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 35 или Люба, выращенных на растворе 0.25 мМ $CaCl_2$ при комнатной температуре и освещении. В опытах использовали следующие реактивы: 100 мкМ 2, 4-DNP (Fluka, США), 5 мкМ CCCP (Serva, США); рН растворов доводили до значения контрольного раствора.

Контролем являлись корни проростков пшеницы, инкубированные в растворе 0.25 мМ CaCl₂ при pH 5.9—6.0.

Мембранный потенциал измеряли с помощью стандартной микроэлектродной техники (Великанов и др., 1992). Микроэлектрод вводили в зону растяжения клеток корня. Содержание АТФ оценивали люциферин-люциферазным методом. Корни пшеницы (150 мг) после инкубации в соответствующих растворах замораживали в жидком азоте и растирали с 1 мл дистиллированной воды. Образцы экстрагировали на водяной бане в течение 3 мин. Далее гомогенат центрифугировали 5 мин при 7000 g. В надосадочной жидкости определяли концентрацию АТФ на квантометрической установке (Опритов и др., 1979).

Интенсивность потребления кислорода определяли манометрическим методом в аппарате Варбурга. Навеску корней (150 г) помещали в сосуды с 3 мл соответствующего раствора и термостатировали 10—15 мин, показания снимали в течение 6 ч. Каждый час корни фиксировали для электронно-микроскопического исследования, а в инкубационном растворе определяли содержание ионов калия на пламенном фотометре ПФМ У 4.2 (Россия).

Для электронной микроскопии нарезали кусочки корня (1—2 мм) из зоны растяжения, фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде (Fluka, Германия) на 0.1 М Na-фосфатном буфере (1.5 ч) и постфиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ (Aldrich, Великобритания) на том же буфере с добавлением сахарозы (25 мг/мл) в течение 2 ч. После дегидратации материала в этаноле, ацетоне и окиси пропилене образцы помещали в эпоксидную смолу Эпон 812 (Serva, Швейцария). Срезы получали на ультрамикротоме LKB III (LKB, Швеция), контрастировали уранилацетатом (10 мин при 60 °С), цитратом свинца (10 мин при комнатной температуре) и просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Jeol, Япония). Анализировали ультраструктуру клеток центрального цилиндра на поперечном срезе корня.

На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки, каждый из экспериментов проведен в 3—5-кратной биологической повторности.

Результаты и обсуждение

Предпосылкой к исследованию влияния протонофоров на структурно-функциональные изменения в клетках корней пшеницы явилось обнаруженное нами ранее несоответствие интенсивности поглощения кислорода клетками и ультраструктуры митохондрий при нарушении работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). При действии на отсеченные корни проростков пшеницы ингибитора III комплекса ЭТЦ митохондрий антимицина А наблюдали примерно одинаковый уровень подавления дыхания в течение 2 ч (Алексеева и др., 1981). Однако электронно-микроскопические исследования показали, что митохондрии в клетках имели совершенно различную ультраструктуру через 1 и 2 ч воздействия. Через 1 ч, хотя в клетках и встречались митохондрии ортодоксального типа, характерные для контрольных растений (органеллы имеют среднюю плотность матрикса, многочисленные неярко выраженные кристы) (рис. 1, а—з), митохондрии имели в основном конденсированный вид (электронно-плотный матрикс, расширенные кристы) (рис. 1, д). Такая гетерогенность популяции митохондрий обуслов-

лена разной степенью функциональной активности органелл при изменении метаболизма в ответ на воздействие и нехарактерна для интактных клеток корней пшеницы в зоне растяжения. Тогда как через 2 ч инкубации матрикс митохондрий полностью просветлялся, а количество крист резко уменьшалось (рис. 1, е), что, по-видимому, связано с непосредственным ингибирующим взаимодействием антимицина А с убихинол цитохром с-оксидоредуктазой дыхательной цепи митохондрий. Возникает вопрос: почему при одинаковой степени подавления дыхания клеток митохондрии в них имеют различную ультраструктуру?

Для ответа на этот вопрос мы продолжили исследования с использованием протонофоров в специально подобранных концентрациях, при которых влияние на интенсивность потребления кислорода имело двухфазный характер (рис. 2, а). В течение 1—4 ч происходило ингибирование дыхания корней при инкубации как со 100 мкМ 2, 4-DNP, так и с 5 мкМ СССР, при этом ультраструктура митохондрий была конденсированной с большим количеством крист (рис. 3, а, з).

Ингибирование потребления кислорода на фоне действия высоких доз разобщителей наблюдали многие исследователи (Полякова и др., 1983; Маркова и др., 1989), в основном они связывают этот процесс с торможением на подступах к дыхательной цепи. Так как подкисление цитоплазмы приводит к подавлению дыхания при действии различных соединений, в том числе и протонофоров, (Барский и др., 1989), авторы делают вывод о том, что pH контролирует дыхание. К настоящему времени показано, что непосредственной причиной снижения скорости дыхания изолированных митохондрий под влиянием разобщителей является снижение значений pH матрикса органелл (Юрков и др., 2005). Но следует учитывать, что воздействие протонофоров на целые клетки и ткани вызывает изменение всех процессов, зависящих от pH и электрохимического градиента протонов, и поэтому более разнообразно. Инкубация корней с протонофорами вызывала выход ионов K⁺ из клеток в инкубационную среду (рис. 2, б) и падение мембранного потенциала (табл. 2). Через 2 ч инкубации в клетках наблюдали концентрически закрученные профили эндоплазматического ретикулума (рис. 3, б, д). Подобные изменения в ультраструктуре эндоплазматического ретикулума происходили при действии мембранотропного соединения аминазина (Полягалова и др., 1982), из чего можно предположить, что протонофоры, являясь липофильными молекулами, постепенно проникали в клетку и оказывали влияние на все мембранные структуры цитоплазмы. Лишь через 5 ч инкубации с 2, 4-DNP можно говорить о его полном разобщающем воздействии на митохондрии, чему соответствуют высокий уровень стимуляции потребления кислорода (выше 100 %) (рис. 2, а), просветление матрикса митохондрий и резкое уменьшение числа крист (рис. 3, в), низкое значение общего содержания АТФ (табл. 1) и мембранного потенциала на плазмалемме (табл. 2) и большее количество ионов K⁺ в инкубационном растворе (рис. 2, б).

Многочасовая (5—6 ч) инкубация корней с СССР приводила к разрушению клеточных структур, в том числе ядра (рис. 3, в). Инкубация с протонофором вызывала своеобразную конденсацию хроматина в ядре. Известно, что при смещении pH к кислым значениям увеличивается количество протонированных групп хроматина, ядерного матрикса и других компонентов ядра, что непосредственно влияет на взаимодействие ДНК с гистонами, РНК, фер-

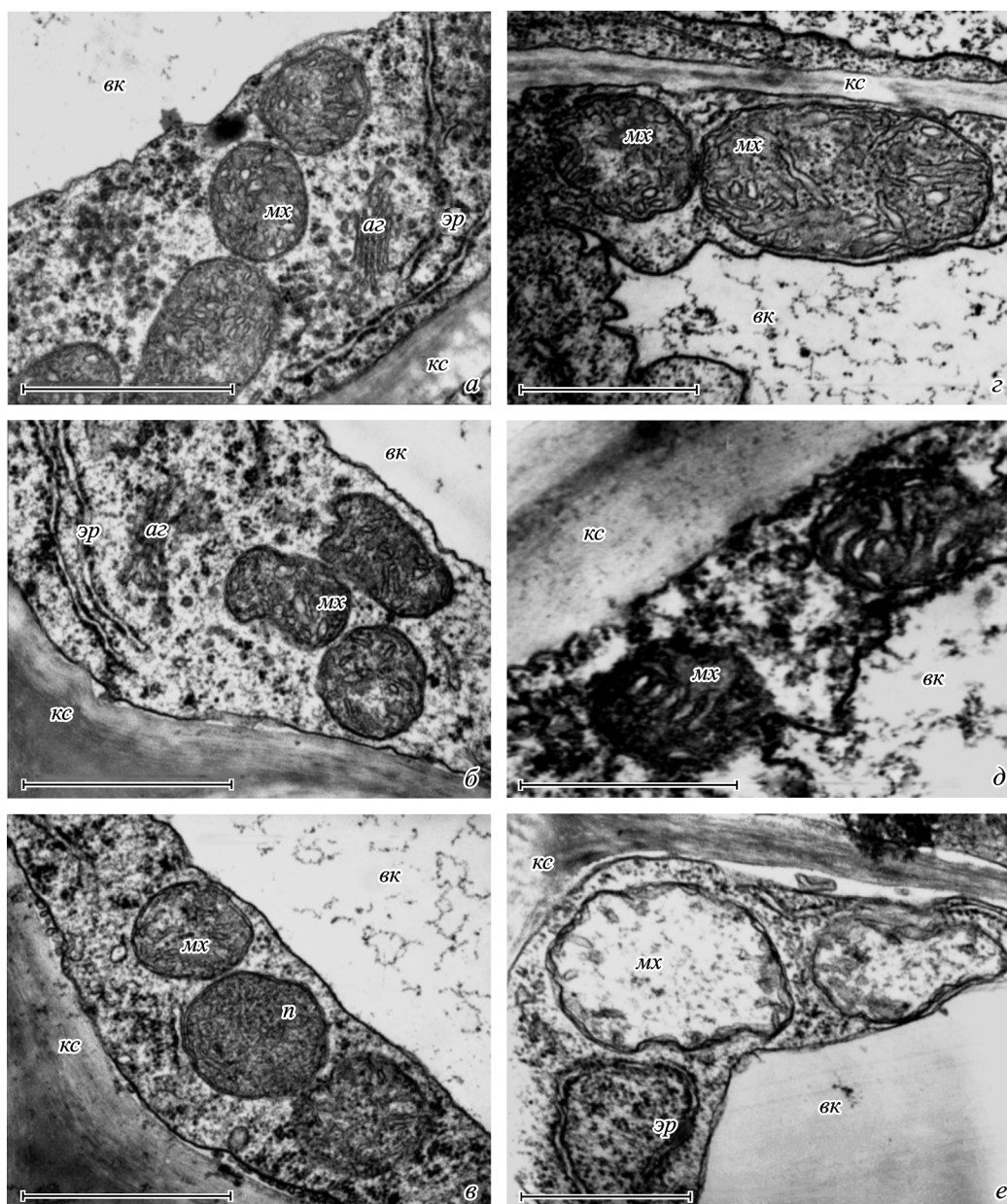


Рис. 1. Ультраструктура клеток корней пшеницы в контрольной среде инкубации CaCl_2 (а–в) и при воздействии антимицина А (г–е).

а — ортодоксальные митохондрии в клетках исходных корней; б — ортодоксальные митохондрии в клетках при инкубации корней в CaCl_2 (1 ч); в — ортодоксальные митохондрии при инкубации в CaCl_2 (6 ч); г — ортодоксальные митохондрии при инкубации с антимицином А (1 ч); д — конденсированные митохондрии при инкубации с антимицином А (1 ч); е — митохондрии с просветленным матриксом и единичными кристами при инкубации с антимицином А (2 ч). аг — аппарат Гольджи, в — вакуоль, кс — клеточная стенка, мх — митохондрия, п — пластида, эр — эндоплазматический ретикулум. Масштабные отрезки — 1 мкм.

ментами матричного синтеза и белками ядерного матрикса, запускается автокаталитическая деструкция пептидных групп белков и сложноэфирных связей нуклеиновых кислот (Сухоруков, Шварцбург, 1985).

Митохондрии в клетках имели неправильную форму и размытые границы как внешней, так и внутренней мембраны, очень конденсированный матрикс, расширенные электронно-прозрачные кристы. Возможно, именно с этим связаны различия в значениях мембранного потенциала и содержания ионов K^+ между двумя используемыми протонофорами. Подобная суперконденсация митохондрий описана для клеток HeLa при воздействии фактора некроза опухоли и рассматривается как заключи-

тельный шаг в развитии апоптоза. В таких органеллах снижен уровень дыхания и трансмембранного потенциала, невозможен синтез АТФ, и в конечном итоге они поглощаются аутофагосомами (Shchepina et al., 2002; Skulachev, 2006).

Таким образом, ультраструктура митохондрий, наблюдаемая нами на протяжении первых 4 ч инкубации, позволяет предположить, что 2, 4-DNP не оказывал на митохондрии непосредственного разобщающего воздействия и снижение АТФ в клетке не являлось следствием нарушения их фосфорилирующей функции. Вероятно, в течение этого времени идет активная выработка АТФ на фоне значительных расходов энергии на нужды

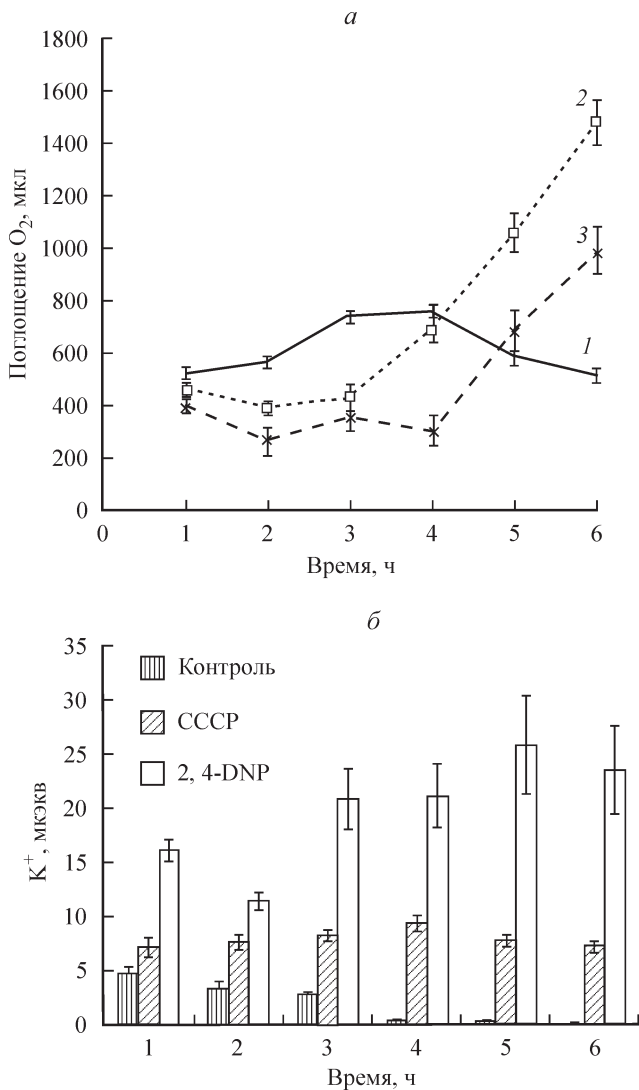


Рис. 2. Интенсивность поглощения кислорода клетками отсеченных корней пшеницы (а) и содержание ионов калия в инкубационном растворе (б) при действии протонифоров.

1 — контроль, 2 — 100 мкМ 2, 4-DNP, 3 — 5 мкМ СССР. Поглощение O_2 (мкл) и содержание K^+ (мкэкв) дано на 1 г сырого веса.

клетки. На это указывает некоторое накопление фонда внутриклеточного АТФ через 4 ч инкубации (табл. 1), что было бы невозможно при нарушении функций митохондриального аппарата и синтеза АТФ только за счет гликолиза. При этом повышался мембранный потенциал плазмалеммы по сравнению с 1-ми ч воздействия (табл. 2), не наблюдалось увеличения содержания ионов K^+ в инкубационном растворе, а интенсивность потребления кислорода клетками достигала контрольного уровня (рис. 2).

По-видимому, 2, 4-DNP в концентрации 100 мкМ способствует значительному поступлению протонов внутрь клетки, снижает рН цитоплазмы, что приводит к активации H^+ -АТФазы плазмалеммы (Felle, 1988; Serrano, 1993; Morsomme, Boutry, 2000). Под воздействием протонифоров увеличивается проницаемость плазмалеммы и для других ионов (Gronewald et al., 1979), что должно активировать соответствующие АТФазы и каналы, являющиеся регуляторами внутриклеточного гомеостаза. По утверждению ряда авторов, на работу АТФаз может расходи-

Таблица 1

Влияние 100 мкМ 2, 4-DNP на содержание АТФ в клетках корней пшеницы

| Время, ч | АТФ, мкМ на 1 г сырого веса | |
|----------|-----------------------------|-------------|
| | CaCl ₂ | 2, 4-DNP |
| 0.4 | 13.81 ± 1.10 | 3.05 ± 0.40 |
| 1.0 | 4.23 ± 0.60 | 1.54 ± 0.20 |
| 2.0 | 2.67 ± 0.50 | 1.89 ± 0.30 |
| 3.0 | 2.39 ± 0.40 | 2.04 ± 0.19 |
| 4.0 | 8.19 ± 0.80 | 4.57 ± 0.46 |
| 5.0 | 3.80 ± 0.40 | 1.58 ± 0.20 |
| 6.0 | 2.25 ± 0.50 | 1.17 ± 0.18 |

Примечание. Содержание АТФ в исходных клетках корней составляло 16.3 ± 0.5 мкМ на 1 г сырого веса.

ваться 40—70 % от всей производимой клетками АТФ (Sussman, Harper, 1989).

Можно сделать следующее предположение, объясняющее низкий уровень поглощения кислорода и активно протекающие процессы фосфорилирования в 1-е часы воздействия протонифоров. Поскольку внешняя мембрана митохондрий проницаема для H^+ , рН в межмембранном пространстве (между внутренней и внешней мембранами митохондрий) соответствует значению рН цитоплазмы. Так как концентрация ионов H^+ в матрике митохондрий ниже, чем в межмембранном пространстве, на внутренней мембране митохондрий создается разность электрических потенциалов, которая служит источником так называемой протондвижущей силы. Благодаря ей ионы водорода движутся обратно в матрикс через АТФ-синтазу, образуя АТФ из АДФ и неорганического фосфата. При незначительном уменьшении рН цитоплазмы H^+ может служить сигналом для активации окислительно-фосфорилирования. Если же концентрация H^+ в цитоплазме продолжает увеличиваться, то ионы водорода поступают по градиенту концентраций в межмембранное пространство митохондрий, увеличивают там свою концентрацию без участия комплексов ЭТЦ, не нарушают условия работы АТФ-синтетазного комплекса, но могут

Таблица 2

Изменение мембранного потенциала клеток корней пшеницы при действии протонифоров

| Время, ч | Мембранный потенциал ($-E_m$, мВ) | | | |
|----------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------|
| | CaCl ₂ (80.6 ± 1.5) | 2, 4-DNP, 100 мкМ | CaCl ₂ (72.0 ± 1.3) | СССР, 5 мкМ |
| 0.4 | 68.0 ± 1.2 | 45.0 ± 8.5 | 67.4 ± 4.1 | 46.0 ± 1.4 |
| 1.0 | 70.0 ± 1.0 | 46.7 ± 3.3 | 75.0 ± 3.9 | 68.0 ± 1.9 |
| 2.0 | 71.0 ± 1.8 | 42.3 ± 4.6 | 72.0 ± 5.9 | 49.0 ± 1.3 |
| 3.0 | 76.0 ± 1.6 | 45.3 ± 3.5 | 73.0 ± 2.7 | 54.0 ± 1.7 |
| 4.0 | 69.0 ± 1.0 | 52.0 ± 4.5 | 77.0 ± 3.6 | 51.0 ± 1.3 |
| 5.0 | 70.0 ± 1.7 | 49.3 ± 2.6 | 73.0 ± 3.1 | 49.0 ± 1.5 |
| 6.0 | 76.0 ± 2.1 | 40.8 ± 2.4 | 79.0 ± 2.4 | 48.0 ± 1.6 |

Примечание. В скобках указано исходное значение мембранного потенциала.

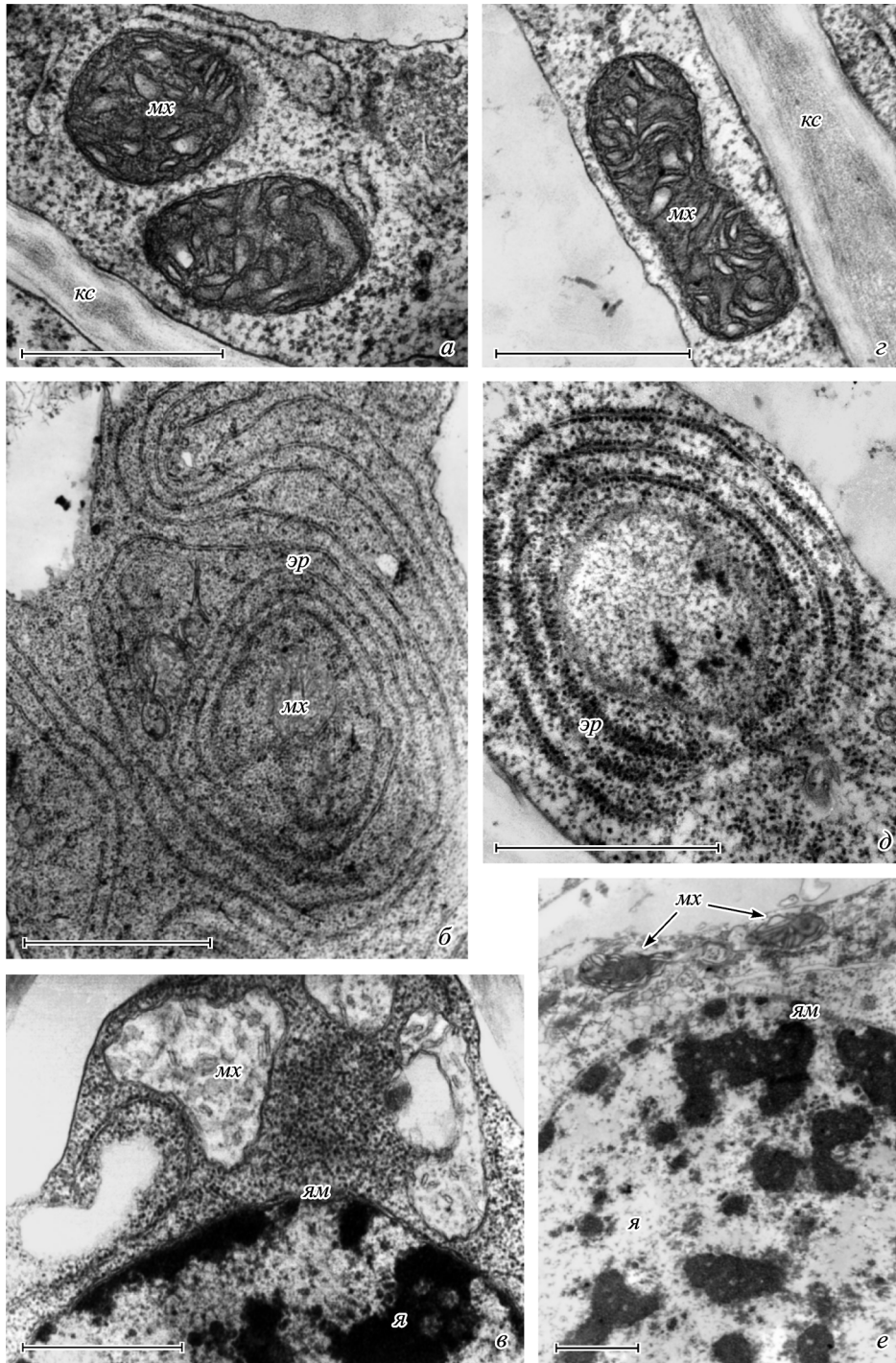


Рис. 3. Изменения ультраструктуры клеток корней пшеницы при многочасовой инкубации с 2, 4-DNP (*a—в*) и CCCP (*г—е*). *a* — конденсированные митохондрии (1 ч); *б* — концентрическое замыкание каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума (2 ч); *в* — просветленные митохондрии неправильной формы (5 ч); *г* — конденсированные митохондрии (1 ч); *д* — концентрическое замыкание каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума (2 ч); *е* — конденсированный хроматин в ядре разрушающейся клетки, суперконденсированные митохондрии неправильной формы с размытыми мембранами (5 ч). *я* — ядро, *ям* — ядерная мембрана; остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 1 мкм.

замедлять при этом окисление NAD(P)H в дыхательной цепи. Таким образом, происходит подавление поглощения кислорода клетками, но сохраняется фосфорилирование (конденсированная структура митохондрий).
Электронно-микроскопические исследования показали, что через 2—3 ч после начала действия протонофоров происходит не только конденсация матрикса, но и перестройка крист в митохондриях. На поперечном срезе кри-

сты имеют вид пропеллеров, в центре которых находится капилляр. На продольном срезе такие кристы выглядят в виде параллельно расположенных стопок (рис. 4, *a, б*). То, что это одна и та же структура, хорошо видно на «косом» срезе через митохондрию (рис. 4, *a*, митохондрия в верхнем правом углу). При действии CCCP, который является более сильнодействующим протонофором, чем 2, 4-DNP, наблюдали и более сложную организацию

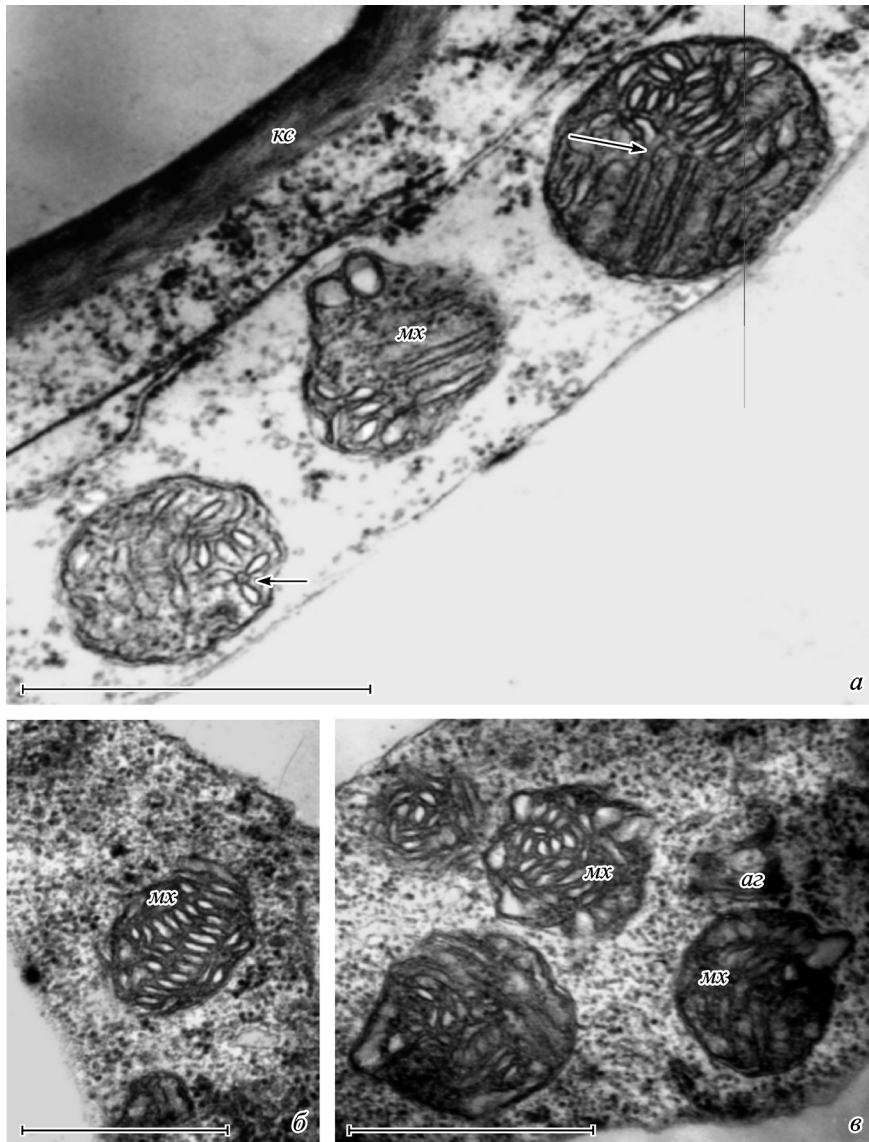


Рис. 4. Сложная пространственная организация крист в митохондриях, обнаруженная при воздействии протонофоров.

а — кристы расположены в виде лопастей пропеллера (стрелкой указано место присоединения крист к центральному капилляру); *б* — кристы расположены стопками, параллельно друг другу; *в* — кристы расположены веером вокруг капилляра. Обозначения те же, что и на рис. 1, 2. Масштабные отрезки — 1 мкм.

крист. На поперечном срезе они имели вид цветка или веера — несколько лопастей, в центре которых также находился капилляр (рис. 4, *в*). Параллельное расположение крист в митохондриях описано многими исследователями. Органеллы с такой ультраструктурой крист были обнаружены в меристематических клетках каллуса капусты через 5 сут после добавления в среду цитокинина (Аветисова, Марьяхина, 1987), а также описаны в клетках коллоптиля и корня риса при аноксии и при добавлении экзогенного нитрата (Vartapetian, Polyakova, 1999; Vartapetian et al., 2003). Во всех этих случаях происходит подкисление цитоплазмы клетки, и авторы связывают такие ультраструктурные перестройки крист в митохондриях с процессами адаптации к данным условиям.

Структурную организацию крист, наблюдаемую нами на рис. 4, очень трудно представить на основании общепринятой складчатой модели (baffle) (Palad, 1952), в которой кристы являются продолжением внутренней мембраны митохондрий, образуя складки внутри матрикса. В по-

следнее время все больше исследователей (Mannella et al., 2001; Perkins et al., 2003; Logan, 2006) склоняются к тому, что кристы являются отдельным структурным компартментом митохондрии, как это впервые было предложено еще в 1953 г. (Sjostrand, 1953). Согласно такой модели (crista junction), кристы соединяются с внутренней мембраной митохондрий через образования в виде трубочек. Эти места соединения и называются «junction». Методом электронной томографии было показано, что эти образования имеют размер приблизительно 28 нм в диаметре и их форма и количество меняются в зависимости от функционального состояния митохондрий (Frey et al., 2002). На представленных нами фотографиях показаны подобные образования, диаметр которых находится в тех же пределах — примерно 30 нм (рис. 4, *а, в*). Однако следует заметить, что данные структуры выявлены лишь в определенный период времени при воздействии протонофоров и не обнаружены в контрольных вариантах, где кристы расположены хаотично (рис. 1, 3). В настоящий мо-

мент остается непонятной функциональная значимость объединения лопастей крист через капилляр, за счет которого, по-видимому, кристы и сохраняют подобную сложную пространственную ориентацию.

Таким образом, в работе представлен широкий спектр конформационных перестроек митохондрий в клетках корней при воздействии протонофоров, которые нельзя объяснить лишь разобщающим воздействием используемых соединений, а, по-видимому, адаптационными возможностями органелл при направленном изменении рН цитоплазмы. Незначительные изменения значений рН цитоплазмы, которые происходят при любых внешних воздействиях, являются сигналом для усиления процесса окислительного фосфорилирования. Более значительное подкисление цитоплазмы приводит к функциональным и ультраструктурным перестройкам митохондрий, направленным на сохранение метаболической активности органелл, а при необратимом сдвиге рН цитоплазмы — к дезэнергизации и гибели клеток.

Список литературы

- Аветисова Л. В., Марьяхина И. Я. 1987. Ультраструктура клеток каллуса капусты на средах с различными регуляторами роста. Физиол. раст. 34 (5) : 1012—1024.
- Алексеева В. Я., Гордон Л. Х., Польшгалова О. О., Николаев Б. А., Сафина Г. Ф. 1981. Динамика дыхания и изменения ультраструктуры митохондрий в корнях пшеницы при длительном воздействии антимицина А. Физиол. раст. 28 (5) : 995—999.
- Барский Е. Л., Назаренко А. В., Самуилов В. Д., Хакимов С. А. 1989. Подавление дыхания клеток *Bacillus subtilis* при пониженном рН цитоплазмы. Биол. мембраны. 6 (7) : 720—724.
- Великанов Г. А., Ценцевский А. Н., Нуриев И. Х., Еварестов А. С., Гордон Л. Х. 1992. Межклеточный перенос воды и ионов в корнях проростков пшеницы. Физиол. раст. 39 (5) : 927—981.
- Косых М. И., Ченцов Ю. С. 1992. Прижизненная комбинация рН в клетках культуры гепатоцитов и тинкториальные свойства этих клеток. Докл. РАН. 327 (1) : 147—150.
- Маркова О. В., Коношенко Г. И., Мохова Е. Н., Тараканова А. Н. 1989. Действие разобщителей окислительного фосфорилирования, олигомицина и ротенона на ультраструктуру митохондрий в лимфоцитах и энергетику этих клеток. Биол. мембраны. 6 (5) : 488—497.
- Опритов В. А., Калинин В. А., Ретивин В. Г. 1979. Теоретические основы и методы изучения биофизических процессов у растений. Горький: ГГУ. 53 с.
- Польшгалова О. О., Гордон Л. Х., Бутакова И. В., Алексеева В. Я., Ценцевский А. Н., Швец И. М. 1991. Адаптация клеток корней пшеницы к измененной протонной проводимости плазмалеммы. Цитология. 23 (5) : 343—349.
- Польшгалова О. О., Сафина Г. Ф., Гордон Л. Х., Алексеева В. Я. 1982. Ультраструктура и дыхательная активность клеток корня при действии аминазина. Цитология. 24 (10) : 1160—1165.
- Полякова И. А., Зоров Д. Б., Лейкина М. И. 1983. Полярнографическое изучение дыхания клеток в культуре ткани. Цитология. 25 (2) : 162—167.
- Пономарева А. А., Польшгалова О. О. 2001. Структурно-функциональные изменения в клетках корней при действии карбонилцианид 3-хлорфенилгидразона. Цитология. 43 (6) : 561—566.
- Сухоруков Б. И., Шварцбург П. М. 1985. Влияние концентрации ионов водорода на состояние хроматина в лимфоидных клетках. Биофизика. 30 (4) : 637—641.
- Тарчевский И. А. 2001. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн. 448 с.
- Юрков В. И., Фадеева М. С., Ягузинский Л. С. 2005. Перенос протона через межфазные границы мембрана—вода в разобщенных митохондриях. Биохимия. 70 (2) : 240—245.
- Felle H. 1988. Shot-term pH regulation in plants. *Physiol. plantarum*. 74 : 583—591.
- Frey T. G., Renken C. W., Perkins G. A. 2002. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. biophys. acta*. 1555 : 196—203.
- Gronewald J. W., Cheeseman J. M., Hanson J. B. 1979. Comparison of the responses of corn root tissue to fusicoccin and washing. *Plant Physiol*. 63 : 255—259.
- Logan D. C. 2006. The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57 : 1225—1243.
- Mannella C. A., Pfeiffer D. R., Bradshaw P. C., Moraru I. I., Slepchenko B., Loew L. M., Hsieh C., Buttle K., Marko M. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*. 52 : 93—100.
- Morsomme P., Boutry M. 2000. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. biophys. acta*. 1465 : 1—16.
- Palad G. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114 : 427—451.
- Perkins G. A., Ellisman M. H., Fox D. A. 2003. Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Mol. Vision*. 9 : 60—73.
- Serrano R. 1993. Structure, function and regulation of plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 325 : 108—111.
- Shchepina L. A., Pletjushkina O. Y., Avetisyan A. V., Bakeeva L. E., Fetisova E. K., Izyumov D. S., Saprunova V. B., Vysso-kikh M. Yu., Chernyak B. V., Skulachev V. P. 2002. Oligomycin, inhibitor of the F₀ Part of H⁺-ATP-synthase, suppressed the TNF-induced apoptosis. *Oncogene*. 21 : 8149—8157.
- Sjostrand F. S. 1953. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*. 171 : 30—31.
- Skulachev V. P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*. 11 : 473—485.
- Sussman M. R., Harper J. F. 1989. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Plant Cell*. 1 : 953—960.
- Vartapetian B. B., Andreeva I. N., Generozova I. P., Polyakova L. I., Maslova I. P., Dolgikh Yu. I., Stepanova A. Yu. 2003. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Ann. Bot.* 91 : 155—172.
- Vartapetian B. B., Polyakova L. I. 1999. Protective effect of exogenous nitrate on the mitochondrial ultrastructure of *Oryza sativa* coleoptiles under strict anoxia. *Protoplasma*. 206 : 163—167.

PROTONOPHORES AS INDUCERS OF ENERGY DEPENDENT CHANGES
IN THE ULTRASTRUCTURE OF WHEAT ROOT CELLS MITOCHONDRIA*O. O. Polygalova, A. A. Ponomareva*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics Kazan Science Center RAS;
e-mail: na.ponomareva@mail.ru

The effects of protonophores, 2, 4-DNP (2, 4-dinitrophenol) and CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), on plasma membrane potential, release of K⁺ into incubation medium, respiratory metabolism, ATP content, and changes in the ultrastructure of cells from excised roots of wheat seedlings were studied. Dissipation of the plasma membrane potential, release of K⁺ ions and inhibition of the rate of oxygen consumption by the cells were observed following 1 h incubation of roots with the protonophores. Mitochondria had condensed appearance with numerous sharply defined and slightly swollen cristae. The evidence for cytoplasmic acidification was provided by an increase in plasma membrane potential, a decrease in K⁺ release into the incubation medium and an increase in ATP content in the cells after 4 h treatment with the protonophores. The protonophores caused unusual spatial arrangements of cristae in mitochondria, e. g. stacked on the top of each other, or having the shape of propellers or florets. Such re-organization of cristae might be of adaptive significance in response to increased concentration of H⁺ in cytoplasm. After 6 h exposure of the cells to the protonophores, cells ultrastructure destruction started. It is suggested that observed ultrastructural changes in the mitochondria reflect changes in their functional activity and the physiological state of cells during their long-term exposure to the protonophores.

Key words: *Triticum aestivum* L., protonophores, ultrastructure, mitochondria, cristae.
