



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


АНАЛИЗ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В СУПРАСТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРИ РАЗВИТИИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Вафина Г.Х., Иванов Р.С., Иванова Э.А.

¹ Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: yafinagh@mail.ru

Целью работы было определение пероксидазной активности во фракциях клеточных ядер (нуклеоплазме, хроматине и ядерном матриксе) при развитии этиолированных зародышей пшеницы. Кроме того, была сопоставлена динамика активности пероксидазы с протеолитической *Arg-X* активностью в ядерных фракциях и с митотической активностью в процессе прорастания этиолированных проростков пшеницы. Из зародышей и проростков были выделены клеточные ядра, которые были расфракционированы путем увеличения ионной силы раствора на нуклеоплазму, хроматин непрочно и прочносвязанный и ядерный матрикс. Активность пероксидазы в ядерных и тканевых фракциях определяли с использованием бензидина в качестве донора водорода и пероксида водорода в качестве его акцептора. *Arg-X* протеолитическую активность оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в богатом аргинином белке протамине. Было показано, что активность пероксидазы коррелирует с *Arg-X* протеолитической активностью в ядерных фракциях, а также с митотической активностью. Выявленная динамика пероксидазной активности в гомогенатных фракциях и ядерных супраструктурах по-видимому связана с процессами деления и растяжения клеток активно идущими в этот период роста проростка. Возможно, что система ядерных протеаз функционирующих на уровне хроматиновых структур осуществляет распознавание и деградацию необратимо модифицированных ядерных белков с целью поддержания целостности генома.

Ключевые слова: пероксидазная активность, *Arg-X*-протеолитическая активность, клеточное ядро, *Triticum aestivum* L.

ANALYSIS OF PEROXIDASE ACTIVITY IN THE SUPRASTRUCTURES OF CELL NUCLEI DURING THE DEVELOPMENT OF ETIOLATED WHEAT GERMS

Vafina G.H., Ivanov R.S., Ivanova E.A.

¹ Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: yafinagh@mail.ru

The aim of the work was to determine the peroxidase activity in fractions of cell nuclei (nucleoplasm, chromatin and nuclear matrix) during the development of etiolated wheat germs. In addition, the dynamics of peroxidase activity was juxtaposed with proteolytic *Arg-X* activity in nuclear fractions and with mitotic activity in the process of germination of etiolated wheat seedlings. Cell nuclei were isolated from entire embryos and seedlings, and then nuclear fractions: nucleoplasm, chromatin loosely and tightly bound, nuclear matrix were extracted by increasing ionic strength of the solution. Peroxidase activity in the nuclear and tissue fractions was determined using benzidine as a hydrogen donor and hydrogen peroxide as its acceptor. The *Arg-X* proteolytic activity was assessed according to the cleavage of *Arg-X* bonds in the arginine-rich protein protamine. It was shown that peroxidase activity was correlated with *Arg-X* proteolytic activity in the nuclear fractions and also with mitotic activity. The dynamics revealed in the peroxidase activity in the tissue and nuclear fractions seems to be related to the processes of cell division and stretching during the germ development. It is quite possible that the system of nuclear proteases functioning at the level of chromatin performs recognition and degradation of irreversibly modified of nuclear proteins in order to maintain the integrity of the genome.

Keywords: peroxidase activity, *Arg-X* proteolytic activity; cell nucleus, *Triticum aestivum* L.

Поступила в редакцию: 26.10.2018

DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-3-124-133](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-3-124-133)

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, активные формы кислорода (АФК) генерируются живыми организмами и в результате нормального клеточного метаболизма и под воздействием факторов окружающей среды. АФК обладают высокой реакционной способностью и если при низких и умеренных концентрациях, они функционируют в физиологических процессах клеток, то при высоких концентрациях, происходят неблагоприятные модификации клеточных компонентов, таких как липиды, белки и ДНК. Сдвиг в окислительном / антиоксидантном равновесии, приводящий к образованию большого количества оксидантов, называется «окислительным стрессом». Регулирование окислительно-восстановительных состояний имеет решающее значение для жизнеспособности клеток. Как следствие, аэробные организмы имеют интегрированные антиоксидантные системы, в том числе ферментативные и неферментативные антиоксиданты, которые эффективно снижают воздействие АФК.

У эукариот образование АФК вызвано, прежде всего, окислительным метаболизмом. В то время как сам кислород обладает очень низкой реакционной способностью, многие клеточные ферменты способны переносить неспаренный электрон на O_2 , приводя к образованию $O_2^{\bullet-}$ и возможному повреждению биомолекул [Kreuz, Fischle, 2016]. Супероксидный радикал $O_2^{\bullet-}$ быстро дезактивируется в митохондриях, цитозоле и ядре с образованием H_2O_2 [Kowaltowski et al., 2009]. H_2O_2 также продуцируется несколькими метаболическими ферментами, такими как пероксисомальная ацил-КоА-оксидаза, или путем окисления белка в эндоплазматическом ретикулуме [Malhotra, Kaufman, 2007; Lodhi, Semenkovich, 2014; Nordgren, Fransen, 2014]. В отличие от $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 может диффундировать через аквапорины и пересекать мембраны органелл, проникая в цитоплазму и ядро [Bienert, Chaumont, 2014]. Если перекись водорода (H_2O_2) не дезактивируется, она может быть превращена в $\bullet OH$ в реакции Фентона. $\bullet OH$ очень токсичен и быстро окисляется, повреждая ДНК, липиды и белки [Kreuz, Fischle, 2016]. Было доказано, что мутагенный эффект АФК усиливается с увеличением уровня плоидности растительных организмов [Гуськов, 2009], например, таких как пшеница.

В последние десятилетия все чаще признается, что активные виды кислорода не только вызывают окислительный стресс и приводят к повреждению клеточных компонентов, но также служат мощными сигнальными молекулами, участвующими в важных клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [D'Autréaux, Toledano, 2007; Janssen-Heininger et al., 2008]. Поэтому была введена концепция «редокс сигнализации», которая описывает целые каскады от восприятия активных видов кислорода до клеточных ответов [Bochner et al., 1984; Proctor, McGinness, 1970]. Поскольку белки являются наиболее распространенными мишенями АФК в клетке, организмы разработали сложные стратегии защиты, чтобы защитить себя от последствий окислительного повреждения [Rinalducci et al., 2008]. Эти стратегии защиты клеток в основном работают на трех разных уровнях: предотвращение образования АФК, перехват и восстановление или удаление поврежденных белков [Müller, Leichert, 2013].

Наиболее распространенная окислительная модификация белка достигается за счет необратимой реакции карбонилирования. Окисление в первую очередь влияет на аминокислоты: Arg, His, Lys, Pro, Trp и Tyr [Møller et al., 2007]. Модификация белков делает их более чувствительными к протеолизу, вероятно, из-за изменения конформации, быстро узнаваемой протеазами. Модифицированные белки удаляются с помощью двух механизмов, использующих протеасомы и протеазы. Первый вариант предполагает участие 20S

убиквитин-независимой протеасомы, которая разрушает белки с нарушенным фолдингом. Механизм распознавания таких белков связан со способностью протеасом идентифицировать участки глобулярных белков, где происходит воздействие гидрофобных радикалов. Таким образом разрушается основное количество карбонилированных белков. Если же начинает функционировать 26S протеасома, то модифицированные белки изначально подвергаются убиквитинированию [Муравлева и др., 2010; Shringarpure et al., 2003; Das, Rouchoudhury, 2014].

Целью исследования было определение пероксидазной активности во фракциях клеточных ядер и во фракциях из гомогената зародышей и проростков пшеницы. Кроме того, была сопоставлена динамика активности пероксидазы с протеолитической Arg-X активностью в ядерных фракциях и с митотической активностью в процессе прорастания этиолированных проростков пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Для исследования были выбраны семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Московская-35. Семена проращивали в темноте при $22 \pm 1^\circ\text{C}$. В определенные интервалы времени, а именно: 0 ч (воздушно-сухое семя), через 24 ч и 48 ч от начала замачивания, у проращиваемых семян отделяли от эндосперма зародыши. Двухсуточные (48 ч) проростки были разделены на колеоптиль, корень и мезокотиль.

Выделение клеточных ядер

Клеточные ядра были выделены с использованием метода, описанного в [Иванова, Вафина, 1991; Авторское свидетельство RUS 1701747]. Зародыши пшеницы растирали в яшмовой ступке при температуре 0°C в среде гомогенизации: 20% глицерина, 0,02 М триэтаноламина (ТЭА-HCl), pH 6,8; 0,005 М MgCl_2 ; 0,025 М KCl; 0,003 М CaCl_2 ; 0,005 М NaCl; 0,004 М *n*-октилового спирта и 0,004 М β -меркаптоэтанола. Гомогенат фильтровали через 4 слоя капрона (размер пор 70 мкм) и центрифугировали при 1250 g в течение 20 мин. Осадок переносили на ступенчатый градиент глицерина, состоящий из 5 слоев (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, вес / объем). Градиентное центрифугирование проводили при 1000 g в течение 1 часа. Осажденные ядра промывали 0,5% Triton X-100 в вышеуказанной среде (без глицерина) с последующим центрифугированием при 1250 g в течение 15 мин. Затем ядра промывали дважды в среде: 0,005 М MgCl_2 ; 0,025 М KCl; 0,003 М CaCl_2 ; 0,005 М NaCl; 0,01 М Трис-HCl, pH 6,8, с последующим центрифугированием в вышеуказанных условиях. Чистоту клеточных ядер контролировали микроскопически (Carl Zeiss Primo Star, Германия).

Фракционирование ядер и тканей проростков

Фракционирование клеточных ядер осуществлялось путем увеличения ионной силы раствора. Фракцию нуклеоплазмы получали с помощью экстракции клеточных ядер 0,14 М NaCl. Фракцию хроматина непрочносвязанного (хроматин-I) получали с помощью 0,35 М NaCl. Фракцию хроматина прочносвязанного (хроматин-II) с помощью 2 М NaCl. Ядерный матрикс был экстрагирован 6 М гуанидин гидрохлоридом (Gu-HCl) с 0,004% β -меркаптоэтанолом [Иванова, Вафина, 1992; Авторское свидетельство RUS 1733471]. Фракционирование гомогената из зародышей и проростков проводили по аналогии с вышеупомянутым способом выделения ядерных фракций. Фракцию 1 выделяли из

гомогената клеточной ткани с помощью 0,14 М NaCl, фракцию 2 с помощью 0,35 М NaCl и фракцию 3 с помощью 2 М NaCl. Фракцию 4 прорастающих зародышей и органов проростков получали 6 М гуанидин гидрохлоридом, содержащим 0,004% β-меркаптоэтанол.

Количество белка во фракциях определяли с помощью метода Бредфорд [Bradford, 1976] с некоторыми модификациями [Иванова, Вафина, 1992; Авторское свидетельство RUS 1733471].

Определение активности пероксидазы

Активность пероксидазы в ядерных и тканевых фракциях определяли с использованием бензидина (Reanal) в качестве донора водорода и пероксида водорода в качестве его акцептора. К 0,1 мл образца добавляли 2 мл 0,038% бензидина в 0,2 М ацетатном буфере (рН 4,7) и 1,9 мл дистиллированной воды, после чего добавляли 1 мл 0,008 М H₂O₂. Образование бензидинового голубого измеряли на (Unico-2800, США) при 610 нм. Активность пероксидазы оценивали в обычных единицах образования бензидинового голубого за 1 с/мг белка [Иванова, Вафина, 1999; Патент RUS 2127761].

Определение Arg-X протеолитической активности

Arg-X протеолитическую активность оценивали по расщеплению Arg-X связей в богатом аргинином белке протамине Salmine-A-I (Merk) [Иванова, Вафина, 1992; Авторское свидетельство RUS 1733471]. 0,5 мл раствора фермента (в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0) с 0,2 мл 0,025% протаминсульфата инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,7 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Затем образцы центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин. К 0,5 мл надосадочной жидкости добавляли 1,25 мл 0,04% раствора 8-гидроксихинолина (Reachim) и 0,25 мл 10% NaOH. Через 2 мин добавляли 0,05 мл NaBrO (1 г брома, растворенного в 100 мл 5% NaOH), и через 15 с добавляли 0,25 мл 40% мочевины. Через 40 с добавляли 2,75 мл холодной дистиллированной воды. Через 5 мин оптическую плотность растворов определяли при A₄₉₀ (Unico-2800, США). Активность Arg-X протеолиза выражали в нмоль аргинина в секунду на 1 мкг белка [Иванова, Вафина, 1992; Авторское свидетельство RUS 1733471].

Определение количества митозов

Органы проростков пшеницы для подсчета количества митозов фиксировали в смеси спирта и уксусной кислоты (3/1) в течение 2 часов. Парафиновые срезы окрашивали метиловым синим. Относительное число митозов было рассчитано на 1000 интерфазных ядер. Для подсчета клеток использовался микроскоп (Carl Zeiss Primo Star, Германия).

Исследования были выполнены на оборудовании ЦКП «Агидель».

Эксперименты повторяли три раза, по меньшей мере тремя химическими повторами и двумя независимыми биологическими образцами, проанализированными в каждый момент времени. Данные представлены как арифметические средние, погрешности представляют собой стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генерация АФК в растениях происходит постоянно в разных клеточных органеллах: митохондриях, хлоропластах, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме, ядре, микросомах, цитозоле, клеточных стенках и апопласте [Dahan et al., 2011].

Супероксиддисмутаза, церулоплазмин, пероксидаза, каталаза и глутатион-зависимые группы, которые поддерживают комплексную антирадикальную защиту биополимера, расположены в различных тканевых структурах и клеточных компартментах. Причина в том, что они плохо проникают через мембраны и тканевые барьеры из-за высокой молекулярной массы. В ряде работ было доказано, что ядро растительных клеток также имеет антиоксидантную окислительно-восстановительную систему [Dahan et al., 2011; Pulido et al., 2009a; Pulido et al., 2009b]. Ядерная ДНК растений хорошо защищена гистонами и другими связанными белками, тогда как митохондриальные и хлоропластные ДНК более восприимчивы к атакам АФК из-за их близости к местам их образования [Гуськов, 2009; Das, Rouchoudhury, 2014]. Вероятно, степень устойчивости организма зависит от адаптивного потенциала, определяемого его генотипом. Геномы пластид и митохондрий имеют незначительную информационную емкость по сравнению с ядерными. Однако функционально они непосредственно участвуют в наиболее важных процессах автотрофной жизнедеятельности, то есть внутриклеточном дыхании и фотосинтезе, и эти функции, в свою очередь, определяют адаптивные реакции растений на стресс. Поскольку пластиды и митохондрии играют ключевую роль в поддержании окислительного гомеостаза растительных клеток, мы провели сравнительный анализ пероксидазной активности в гомогенатных фракциях целых зародышей и их растущих органов и непосредственно в клеточных ядрах.

Как видно на рисунке 1, активность пероксидазной системы в тканях целых зародышей (0 ч-24 ч) и органов проростков (48 ч) проявляется в основном во фракциях 1 и 2. Известно, что антиоксидантная система для организмов находящихся в состоянии вынужденного покоя имеет особое значение. В состоянии покоя в зерновках понижается содержание воды до 5-8%, ослабляется дыхательная активность митохондрий, но сохраняется высокая активность оксидоредуктаз, в особенности пероксидазы [Андреева, 1988]. В покоящихся зерновках пероксидаза способна участвовать в генерации воды, катализируя реакции последовательного восстановления кислорода и пероксида водорода до воды [Рогожин и др., 2000]. Что касается активности пероксидазной системы во фракциях 1 и 2 (24-ч; рис.1), то возможно она связана с началом митотической активности в клетках (рис.2). Было показано, что накопление перекиси водорода и создание определенного окислительно-восстановительного потенциала необходимы для инициирования пролиферации и дифференцировки [Alberts et al., 1994].

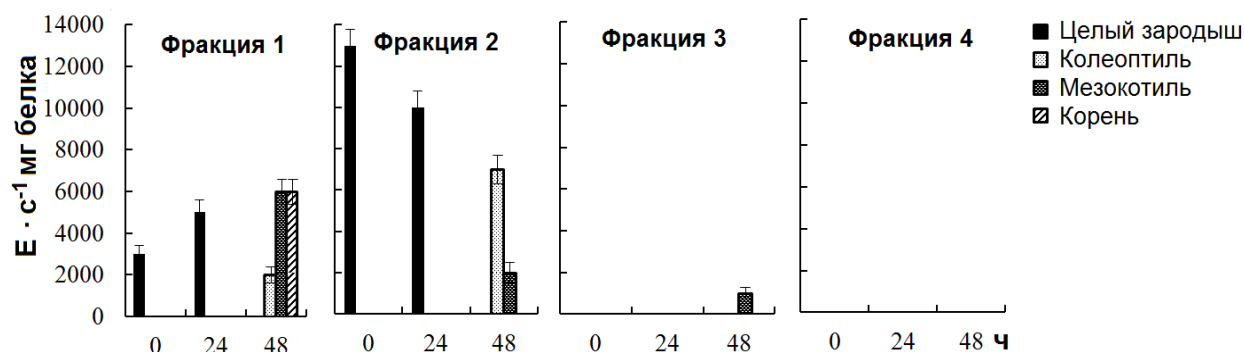


Рис. 1. Активность пероксидазы во фракциях тканей целых зародышей и отдельных органов проростков.

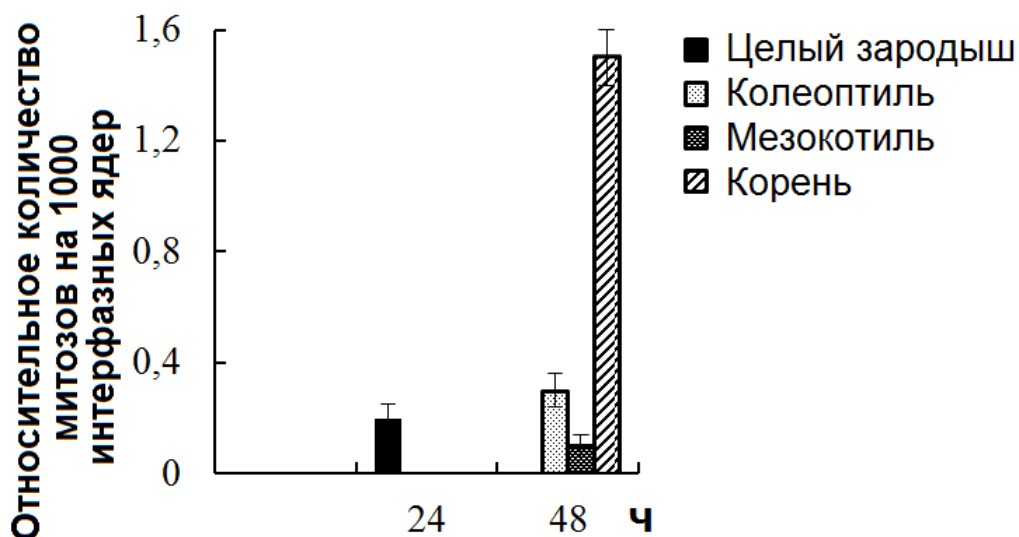


Рис. 2. Митотическая активность в зародышах и отдельных органах проростков

В 48-ч проростках (Рис.1) активность пероксидазы в тканях была обнаружена во всех органах: колеоптиле, мезокотиле, корнях (фракция 1) и в колеоптиле, мезокотиле (фракция 2). Этот период развития растения характеризуется активными процессами деления и растяжения клеток. Было доказано, что участие пероксидазы при индуцируемом ауксином растяжении клеток необходимо для нормального процесса морфогенеза растений [Ahmad, 2014].

Динамика активности пероксидазы в ядрах клеток показана на рисунке 3. Любопытно, что активность была выявлена в нуклеоплазме, хроматине-I и хроматине-II. На уровне ядерного матрикса активности обнаружено не было (рис. 3). Кроме того активность мы не обнаружили и во фракции 4 (рис. 1). Чтобы исключить предположение, что гуанидин гидрохлорид может влиять на активность пероксидазы, был проведен эксперимент с чистым препаратом пероксидазы хрена (Reanal), который показал отсутствие влияния гуанидин-гидрохлорида на активность фермента. Из рисунка 3 видно, что значения активности пероксидазы на уровне клеточного ядра отличаются от величин, полученных в тканевых фракциях целых зародышей и органов проростков (рис.1) на порядок. Функциональная специфичность пластид и митохондрий обуславливает наличие повышенной концентрации свободных радикалов в этих органеллах по сравнению с ядром [Fridovich, 1986; Allen, Raven, 1996]. Кислород проникает в клетку через каналы, ограниченные различными мембранами, и поэтому подвергается инактивации и альтерации молекулярными компонентами клетки, которые препятствуют доступу кислорода или его активных форм к внутриядерным структурам. Митотические хромосомы более восприимчивы к действию вторичных метаболитов по сравнению с интерфазой, прежде всего потому, что у них нет ядерной оболочки. По мнению некоторых авторов, система клеточных мембран появилась в процессе эволюции для защиты генетического материала от токсичного воздействия кислорода. Было показано, что ядерная мембрана, в отличие от мембран других органелл эукариотической клетки, более устойчива к перекисному окислению из-за особенностей ее фосфолипидного состава [Гуськов, 2009].

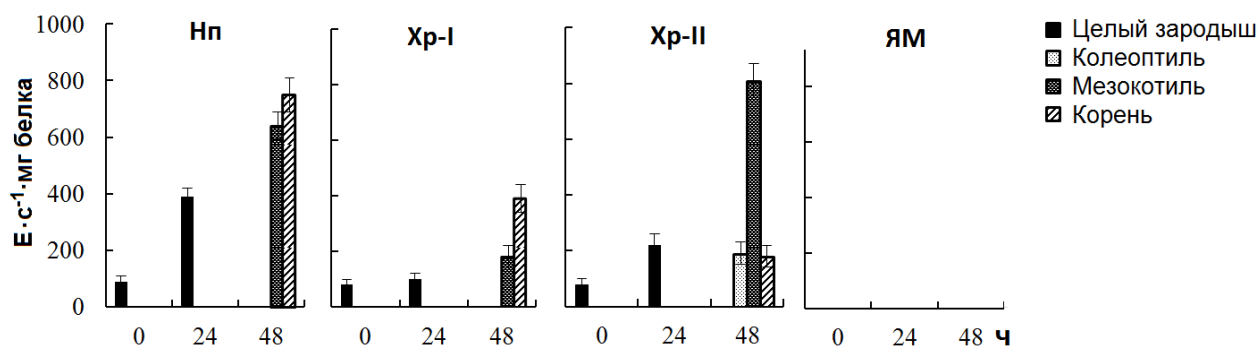


Рис. 3. Пероксидазная активность во фракциях клеточных ядер
(Нп-нуклеоплазма, Хр-I – хроматин непрочносвязанный,
Хр-II – хроматин прочносвязанный, ЯМ- ядерный матрикс).

Анализ рисунка 3 показывает, что невысокий уровень активности пероксидазы в клеточных ядрах поддерживается у воздушно-сухих зародышей в нуклеоплазме, хроматине-I и хроматине-II, по-видимому, с целью регулирования перекисного окисления липидов. У 24-часовых зародышей также сохраняется относительно невысокий уровень пероксидазной активности в нуклеоплазме, хроматине-I и хроматине-II, что возможно, связано с активным ростом клеток путем растяжения и началом пролиферативной активности. В 48-ч проростке наблюдается довольно высокий уровень активности пероксидазы, связанный в основном с корневой системой и мезокотилем (Рис. 3: нуклеоплазма, хроматин-I и хроматин-II), где, как известно в зонах апикальной меристемы происходит деление клеток, а определенные пласты клеток растут растяжением.

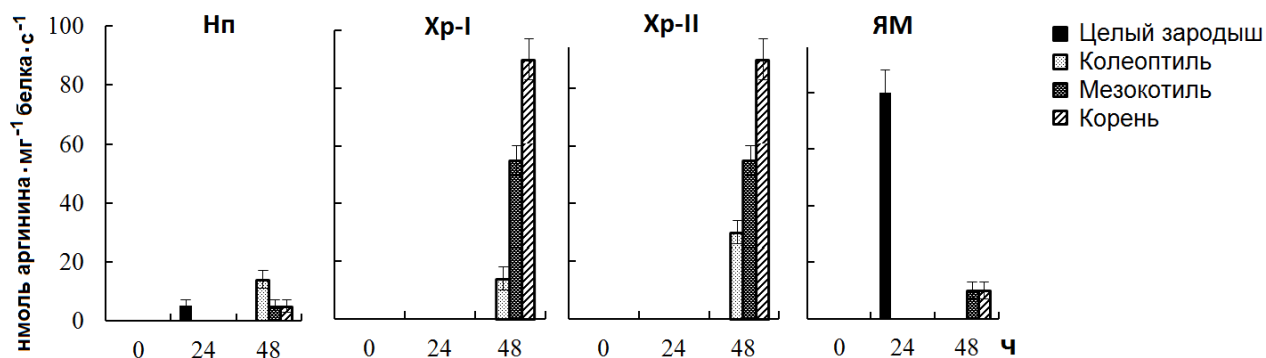


Рис. 4. Активность Arg-X протеолиза во фракциях клеточных ядер
(Нп-нуклеоплазма, Хр-I – хроматин непрочносвязанный,
Хр-II – хроматин прочносвязанный, ЯМ- ядерный матрикс).

На рис. 4 представлена динамика активности *Arg-X* протеолиза в ядерных супраструктурах. Как видно из рисунка, высокий уровень *Arg-X* протеолитической активности приходится на ядерный матрикс 24 ч зародышей, что, по-видимому, связано с процессами роста клеток растяжением. В период 48 ч роста у отдельных органов зародыша отмечается слабая инициация активности в нуклеоплазме блока: колеоптиль, междуузлие, корень, которая синхронно повышается в супраструктурах хроматина-I и хроматина-II. Анализ рисунка 2 (48ч) показывает, что большое количество митозов приходится на корневую систему и значительно меньше на колеоптиль и мезокотиль. Очевидно, что процессы сборки и разборки хроматина при участии ядерных белков особенно интенсивно

идут в этот период в корневой системе и значительно меньше в колеоптиле и мезокотиле. Что касается *Arg-X* протеолиза, то высокий уровень активности так же наблюдается в корневой системе во фракциях хроматина-I и хроматина-II и несколько ниже в мезокотиле и колеоптиле (48 ч).

Известно, что ядерные белки активно модифицируются АФК, что в свою очередь влияет на их фолдинг и стабильность, а также на их способность к посттрансляционным модификациям. Любые изменения на уровне гистонов оказывают значительное влияние на структуру хроматина, экспрессию генов, стабильность генома и репликацию [Kreuz, Fischle, 2016]. Например, карбонилирование гистонов может маскировать положительные заряды и, таким образом, влиять на релаксацию хроматина и сборку транскрипционных факторов [Sadakierska-Chudy, Filip, 2015]. Было показано, что в активной фазе синтеза ДНК обнаруживается высокий уровень карбонилирования гистонов; кроме того, когда активируется ядерная протеасома; уровень модифицированных белков значительно снижается [Wondrak et al., 2000; García-Giménez et al., 2012]. На сегодняшний день крайне мало исследований, касающихся функций и специфичности ядерных протеиназ, чтобы с уверенностью описать оборот карбонилированных белков в клеточном ядре. Вполне возможно, что одна из функций ядерных протеиназ – это контроль качества фолдинга ядерных белков.

В последнее время много проводится исследований, рассматривающих АФК с позиции сигнальных молекул. АФК мгновенно образуются, обладают высокой реакционной способностью, могут вступать в реакции с мембранными липидами, углеводами, белками и ДНК. АФК, такие например как пероксид водорода, могут проходить через биологические мембраны с помощью аквапоринов. В свою очередь клетки имеют эффективные антиоксидантные системы, чтобы осуществлять строгий контроль над АФК. В совокупности, все эти факторы делают АФК идеальными участниками клеточного сигналинга [Sewelam et al., 2016].

Вполне возможно, что система ядерных протеаз, функционирующая на уровне хроматиновых структур, распознает и разрушает необратимо модифицированные ядерные белки, с целью сохранения целостности генома.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. Н.Б. Трошиной, сотруднику Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, за определение числа митозов в зародышах и проростках, используемых в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 129 с.
2. Гуськов Е.П. Генетика окислительного стресса. Ростов н/Д: Изд-во СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009. 156 с.
3. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Бакенова Р.А., Култанов Б.Ж., Танкибаева Н.А., Койков В.В., Омарова Г.А. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундаментальные исследования. 2010. Т. 1. С. 74-78.

4. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Филиппова Н.П. Изменение реакции антиоксидантной системы проростков пшеницы после ультрафиолетового облучения семян // Биофизика. 2000. Т. 45. № 4. С. 730-736.
5. Способ выделения растительных клеточных ядер. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Авторское свидетельство RUS 1701747 01.09.1991.
6. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Авторское свидетельство RUS 1733471 15.01.1992.
7. Способ определения окислительно-восстановительной активности пероксидазной системы в клеточных ядрах проростков пшеницы. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Патент RUS 2127761 20.03.1999.
8. Ahmad P. Oxidative damage to plants. Antioxidant networks and signaling. Elsevier Inc., 2014. 672 p.
9. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing, 1994. 1361 p. DOI: [10.1016/0307-4412\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0307-4412(94)90059-0)
10. Allen J.F., Raven J.A. Free-radical-induced mutation vs. redox regulation: costs and benefits of genes in organelles // Journal of Molecular Evolution. 1996. V. 42. № 5. P. 482–492.
11. Bienert G.P., Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide // Biochimica et Biophysica Acta. 2014. V. 1840. № 5. P. 1596–1604. DOI: [10.1016/j.bbagen.2013.09.017](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017)
12. Bochner B.R., Lee P.C., Wilson S.W., Cutler C.W., Ames B.N. AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress // Cell. 1984. V. 37. № 1. P. 225-232.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. 1976. V 72, № 1–2. P. 248-254
14. D'Autréaux B., Toledano M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007. V. 8. № 10. P. 813-824.
15. Dahan J., Koen E., Dutartre A., Lamotte O., Bourque S. Post-translational modifications of nuclear proteins in the response of plant cells to abiotic stresses. In: Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives, edited by Shanker A (InTech). 2011. P. 76-112. <https://www.intechopen.com/books/how-to-link/abiotic-stress-response-in-plants-physiological-biochemical-and-genetic-perspectives>
16. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // Frontiers in Environmental Science. 2014. V. 2. Article 53. DOI: [10.3389/fenvs.2014.00053](https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053)
17. Fridovich I. Superoxide dismutase // Advances in Enzymology. 1986. V. 58. P. 61–97.
18. García-Giménez J.L., Ledesma A.M., Esmoris I., Romá-Mateo C., Sanz P., Viña J., Pallardó FV. Histone carbonylation occurs in proliferating cells // Free Radical Biology and Medicine. 2012. V. 52. № 8. P. 1453–1464. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.022](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.022)
19. Janssen-Heininger Y.M.W., Mossman B.T., Heintz N.H., Forman H.J., Kalyanaraman B., Finkel T., Stamler J.S., Rhee S.G., van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises // Free Radical Biology and Medicine. 2008 V. 45. № 1. P. 1-17. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011)

20. Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.R.E. Mitochondria and reactive oxygen species // *Free Radical Biology and Medicine*. 2009 V. 47. № 4. P. 333–343. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004)
21. Kreuz S., Fischle W. Oxidative stress signalling to chromatin in health and disease // *Epigenomics*. 2016. V. 8. № 6. P. 843–862. DOI: [10.2217/epi-2016-0002](https://doi.org/10.2217/epi-2016-0002)
22. Lodhi I.J., Semenkovich C.F. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling // *Cell Metabolism*. 2014. V. 19. № 3. P. 380–392. DOI: [10.1016/j.cmet.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002)
23. Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? // *Antioxidant and Redox Signaling*. 2007. V. 9. № 12. P. 2277–2293. DOI: [10.1089/ars.2007.1782](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782)
24. Møller I.M., Jensen P.E, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // *Annual Review of Plant Biology*. 2007. V. 58. P. 459–481. DOI: [10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946)
25. Müller A. Leichert L.I. Redox Proteomics. In: *Oxidative Stress and Redox Regulation*, edited by Jakob U., Reichmann D. New York: Springer, 2013. 157 p.
26. Nordgren M., Fransen M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress // *Biochimie*. 2014. V. 98. P. 56–62. DOI: [10.1016/j.biochi.2013.07.026](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.026)
27. Proctor P., McGinness J.E., Levodopa side-effects and the Lesch-Nyhan syndrome // *Lancet*. 1970. V. 2. № 7687. P. 1367. DOI: [10.1016/S0140-6736\(70\)92399-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)92399-8)
28. Pulido P., Cazalis R., Cejudo F.J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress // *Plant Journal*. 2009 a. V. 57. № 1. P. 132–145. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2008.03675.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03675.x)
29. Pulido P., Dominquez F., Cejudo F.J. A hydrogen peroxide detoxification system in the nucleus of wheat seed cells: protection or signalling role? // *Plant Signalling Behaviour*. 2009 b. V. 4. № 1. P. 23–25.
30. Rinalducci S., Murgiano L., Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59. № 14. P. 3781–3801. DOI: [10.1093/jxb/ern252](https://doi.org/10.1093/jxb/ern252)
31. Sadakierska-Chudy A., Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs // *Neurotoxicity Research*. 2015. V. 27. № 2. P. 172–197. DOI: [10.1007/s12640-014-9508-6](https://doi.org/10.1007/s12640-014-9508-6)
32. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global plant stress signalling: reactive oxygen species at the cross-road // *Frontiers Plant Science*. 2016. V. 7. P. 187. DOI: [10.3389/fpls.2016.00187](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00187)
33. Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278. № 1. P. 311–318. DOI: [10.1074/jbc.M206279200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206279200)
34. Wondrak G.T., Cervantes-Laurean D., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Histone carbonylation in vivo and in vitro // *The Biochemical Journal*. 2000. V. 351. № 3. P. 769–777.