

## ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

И.В. Жигачева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, [zhigacheva@mail.ru](mailto:zhigacheva@mail.ru)

**Аннотация.** Исследована биологическая активность 1-(карбокситетрагидрокси)-1-(N-ацетиламино)-2-(3',5'-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил) - пропионата натрия (натрий анфена) и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-фенил пропионата калия (калий фенозан). Показано, что в условиях дефицита воды  $10^{-6}$  М калий фенозан и  $10^{-13}$  М натрий анфен предотвращали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха и предупреждали торможение роста проростков, что, возможно, обусловлено антиоксидантной активностью препаратов.

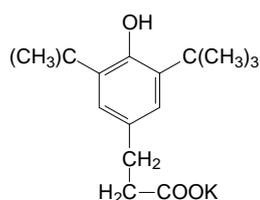
**Ключевые слова:** антиоксиданты, митохондрии, дефицит воды, ПОЛ

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1236-1240

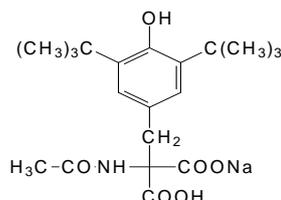
Активные формы кислорода (АФК) непрерывно образуются в результате различных обменных процессов в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Обладая сигнальной функцией, они регулируют экспрессию генов и активность стресс-протекторных систем [Колупаев, Карпец, 2010]. Благодаря работе антиоксидантной системы, стационарный уровень этих интермедиатов в клетках растений достаточно низкий (около  $10^{-10}$  М). Смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия, приводящее к увеличению содержания АФК в клетках, происходит при действии сильных стрессоров или при длительном воздействии стрессовых факторов. Их накопление может являться причиной повреждения различных структур, проявляющееся в окислении -SH-групп белков, фрагментации пептидных цепей, повышении чувствительности белков к действию протеаз. Они вызывают повреждение азотистых оснований ДНК, модификация которых становится причиной разрывов водородных связей между цепями ДНК и повреждения хромосом [Максимов, Черепанова, 2006]. Мы предположили, что антиоксиданты, снижая содержание АФК в клетке, будут увеличивать устойчивость растений к действию стрессовых факторов. Для этих целей можно использовать антиоксиданты из группы пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ).

Доказано, что антиоксидантные свойства молекул ПЗФ обусловлены наличием в их структуре ОН-групп, которые образуют сопряженную систему со связями ароматического кольца. Особенности строения этой группы антиоксидантов определяют их способность легко взаимодействовать с различными свободными радикалами, нейтрализуя их и образуя при этом фенокси-радикалы, являющиеся мало реакционноспособными по отношению к другим радикалам и молекулам [Ершов и др., Володькин, 1972]. Отметим, что в низких дозах ПЗФ проявляют антиоксидантную активность, а в высоких - выступают в роли прооксидантов, что может усугубить пероксидацию.

Исходя из этого, объектом исследования были выбраны антиоксиданты из класса ПЗФ – калий фенозан (3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-фенил пропионат калия) и натрий анфен (1-(карбокситетрагидрокси)-1-(N-ацетиламино) -2-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил) – пропионат натрия):



Калий фенозан



Натрий анфен

Целью исследования было изучение влияния этих препаратов на энергетику митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа, в условиях дефицита воды.

**Материалы и методы.** Работу проводили на митохондриях 5 дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором  $\text{KMnO}_4$ . Контрольную группу семян в течение 39 мин. замачивали в воде, а опытную группу – в растворе исследуемых ПЗФ (соответствующей концентрации). Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. Спустя сутки половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные ПЗФ, на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Затем семена группы ДВ переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытной группы – на фильтровальную бумагу, увлажненную исследуемыми ПЗФ, где семена обеих групп находились в течение последующих 2 суток. Семена контрольной группы оставались на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

*Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха* проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 g в течение 5 мин и при 3000 g в течение 3 мин) [Попов и др., 2003]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

*Скорости дыхания митохондрий* проростков гороха регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7,2), 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , и 0,1% БСА.

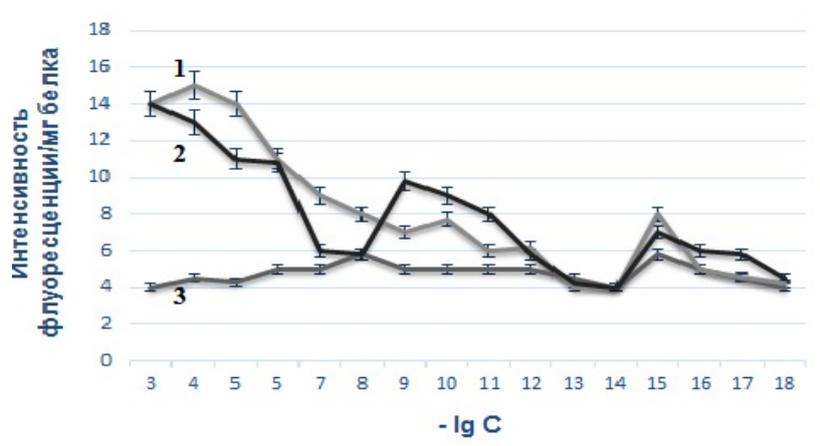
*Перекисное окисления липидов (ПОЛ)* оценивали флуоресцентным методом [Fletcher et al., 1973]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол=2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол=1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Для активации ПОЛ митохондрии этиолированных 5 дневных проростков гороха на 15 мин помещали в 0,5 мл среды, содержащей 0,2 М сахарозу, 10 мМ HEPES и 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 («старение» митохондрий). Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

*В эксперименте использовали реактивы фирм:* сахароза, Трис, ЭДТА, FCCP, малат, глутамат (“Sigma Aldrich,” США); БСА, (свободный от ЖК) (“Sigma Aldrich,” США); HEPES (“MP Biomedicals”, Германия).

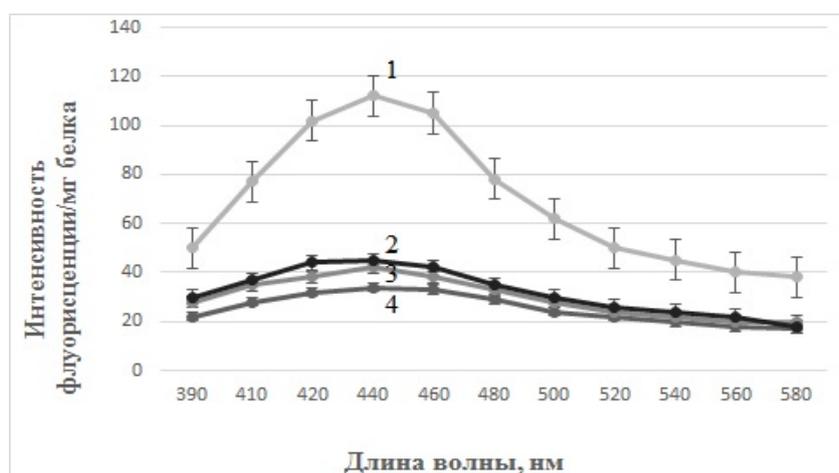
**Результаты и обсуждение.** Инкубация митохондрий в гипотоническом растворе сахарозы вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло

отражение в увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 3-4 раза (рис. 1).



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций натрий анфена, калий фенозана и «старения» на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 – «старение» митохондрий+натрия анфен (АНФ); 2 – «старение» митохондрий+калия фенозан (ФЕН); 3 – контроль.

Введение исследуемых ПЗФ в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозозависимую зависимость. Калий фенозан в концентрации  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  М и  $10^{-12}$ - $10^{-14}$  М уменьшал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха почти до контрольных значений. Натрий анфен эффективно снижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в концентрациях  $10^{-11}$ - $10^{-14}$  М и  $10^{-16}$ - $10^{-18}$  М, что, возможно, указывало на наличие антистрессовых свойств у исследуемых ПЗФ.



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян натрий анфеном (АНФ) или калий фенозаном (ФЕН). 1 – ДВ; 2 – ДВ+АНФ; 3 – ДВ+ФЕН; 4 – контроль.

Наличие этих свойств у исследуемых ПЗФ мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали калий фенозан в концентрации  $10^{-8}$  М и натрий анфен в

концентрации  $10^{-13}$  М, т.е. использовали ПЗФ в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ. Дефицит воды приводил к активации свободно радикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Отметим, что обработка семян гороха ПЗФ вызывала снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ (рис. 2). При этом изменялись и физиологические показатели: дефицит воды тормозил рост проростков. Обработка семян гороха  $10^{-13}$  М натрий анфеном или  $10^{-6}$  М калий фенозаном предотвращала торможение роста корней и побегов в этих условиях. В этом случае корни саженцев, обработанных калий фенозаном, были более длинными на 45%, чем в контрольных образцах, а обработанные натрий анфеном – на 31%, что имеет большое адаптивное значение в условиях дефицита воды.

Основываясь на полученных результатах, можно прийти к заключению, что адаптогенные свойства исследованных ПЗФ могут быть обусловлены их антиоксидантной и антирадикальной активностью. По данным [Перевозкина, 2003] эффективный коэффициент взаимодействия калий фенозана с пероксильными радикалами при окислении метилолеата ( $60^\circ$ )  $k_7$  равен  $2,2 \times 10^4$  (Мс) $^{-1}$ . Близкие значения  $k_7$  отмечены и для натрий анфена. Однако, защитный эффект препаратов за счет антирадикальных свойств, вероятно, мог проявиться лишь в концентрации  $10^{-6}$  М. В данной концентрации препараты, возможно, встраивались в биологические мембраны и взаимодействовали с окружающими фосфолипидами [Бурлакова, 2006].

#### Литература

Бурлакова Е.Б. Блеск и нищета антиоксидантов // Наука и жизнь. – 2006. – № 2. – С. 18–20

Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. – М: Химия, 1972. – 352 с.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. – Киев: Основа, 2010. – 352 с.

Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – С. 250–261.

Перевозкина М.Г. Кинетика и механизм ингибирующего действия производных фенозана, салициловой кислоты и их синтетических смесей с  $\alpha$ -токоферолом и фосфолипидами. – Автореферат к.х.н. – Тюмень, 2003. – 24 с.

Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха // Биохимия. 2003. – Т. 68, № 7. – С. 910–916.

Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И., Орехова С.О., Шугаев А.Г. Влияние водного дефицита на дыхание проводящих пучков листового черешка сахарной свеклы // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 373–380.

Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Anal. Biochem. – 1973. – V. 52. – P. 1–9.

## THE SPATIAL HINDERED PHENOLS INCREASE THE STABILITY OF PEA SEEDLING TO STRESS IMPACTS

I.V. Zhigacheva

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, *zhigacheva@mail.ru*

**Abstract.** The biological activity of 1-(carboxy)-1-(N-acetylamino)-2-(3', 5'-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionate sodium (sodium anphen) and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl potassium propionate (potassium phenosan) was studied. It was shown that in conditions of water deficiency  $10^{-6}$  M potassium phenosan and  $10^{-13}$  M sodium anphen prevented the activation of LPO in mitochondrial membranes of etiolated pea seedlings and prevented inhibition of seedling growth, which may be due to antioxidant activity of the preparations.

**Keywords:** *antioxidants, mitochondria, water deficiency, LPO*