

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

Аннотация. Исследована биологическая активность 1-(карбокси)-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.

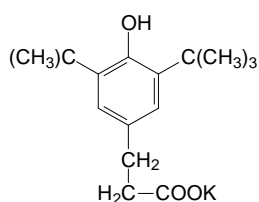
Ключевые слова: антиоксиданты, митохондрии, дефицит воды, ПОЛ

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

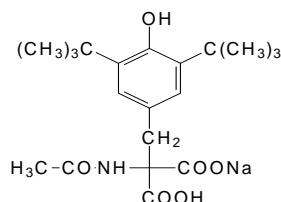
Активные формы кислорода (АФК) непрерывно образуются в результате различных обменных процессов в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Обладая сигнальной функцией, они регулируют экспрессию генов и активность стресс-протекторных систем [Колупаев, Карпец, 2010]. Благодаря работе антиоксидантной системы, 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-(карбокси)-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 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 оставалась 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 KH_2PO_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 KH_2PO_4 , 4 мМ 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 KH_2PO_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).

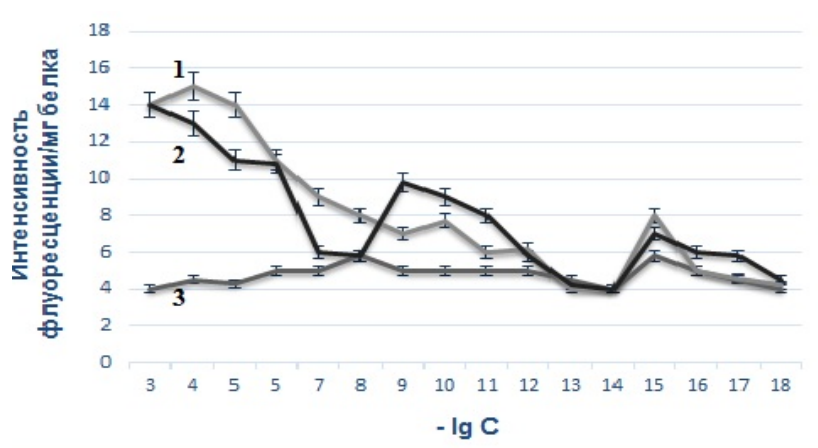


Рис. 1. Влияние различных концентраций натрий анфена, калий фенозана и «старения» на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 – «старение» митохондрий+натрия анфен (АНФ); 2 – «старение» митохондрий+калия фенозан (ФЕН); 3 – контроль.

Введение исследуемых ПЗФ в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозовую 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.

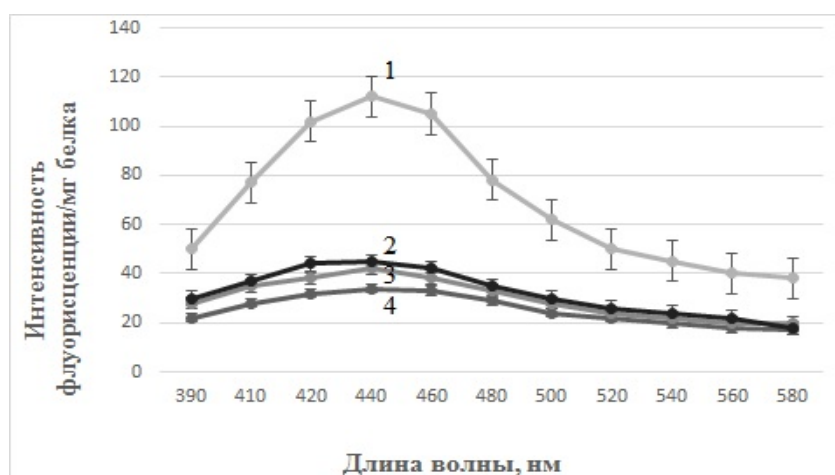


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этилированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян натрий анфеном (АНФ) или калий фенозаном (ФЕН). 1 – ДВ; 2 – ДВ+АНФ; 3 – ДВ+ФЕН; 4 – контроль.

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°) 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 α -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., Вискребенцева 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*