

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВОДЫ

И.В. Жигачева<sup>1</sup>, И.Ф. Русина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия, [zhigacheva@mail.ru](mailto:zhigacheva@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия, [rusina939@mail.ru](mailto:rusina939@mail.ru)

**Аннотация.** Используя модель дефицита воды (ДВ) исследовали антистрессовые свойства N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (З-ОП). ДВ приводил к 3-кратному росту интенсивности ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха и 30% снижению максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов.  $10^{-9}$  М З-ОП предотвращал активацию ПОЛ в мембранах митохондрий, что обеспечивало эффективную работу электрон-транспортной цепи митохондрий и повышало устойчивость проростков к ДВ.

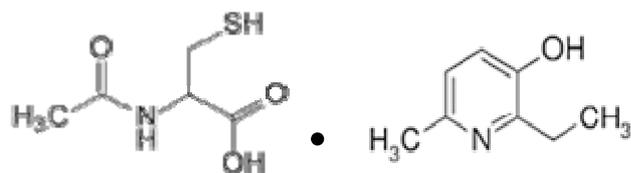
**Ключевые слова:** производные 3-гидроксипиридина, митохондрии, дефицит воды

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-323-327

Доступность воды – важный экологический фактор, от которого зависит рост, урожайность и выживание растений. Вода участвует во всех метаболических процессах, поддерживая структуру цитоплазмы, стабильность ее коллоидных компонентов и определенную конформацию белков. Растения, перенесшие сильную кратковременную засуху, так и не возвращались к нормальному обмену веществ [Boyer, 1982].

Известно, что реализация антистрессовых программ требует больших энергетических трат [Шакирова и др., 2003]. При этом митохондрии играют одну из ключевых ролей в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах клетки [Atkin, Macherel, 2009]. Тем не менее, в условиях стресса эти органеллы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) [Зоров и др., 2007]. Увеличение генерации АФК митохондриями при стрессе может привести к взаимодействию АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран митохондрий, такими как линолевая и линоленовая кислоты, что приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Активация процессов ПОЛ может быть одной из причин утечки цитохрома *c* и нарушения электрон-транспортной функции цитохромоксидазного участка дыхательной цепи митохондрий.

Можно предположить, что препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов, в том числе и к дефициту воды. В качестве таких препаратов, вероятно, могут быть использованы производные 3-гидроксипиридина (З-ОП). Исследования биологических свойств производных З-ОП позволили установить, что данные соединения могут выступать в качестве потенциальных защитных агентов при действии на организм различных повреждающих факторов. В связи с этим в качестве объектов исследования нами были выбран препарат, относящийся к производным 3-гидроксипиридина - N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин (З-ОП), предотвращающий активацию ПОЛ в модельных экспериментах:



Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий [Шугаева и др., 2007] интересно было выяснить, как влияет N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин (3-ОП) на функциональное состояние митохондрий проростков гороха, подвергнутых 2-х дневному водному дефициту. Использовали 3-ОП в той концентрации, в которой он снижал интенсивность ПОЛ до контрольных значений ( $10^{-9}$  М).

### **Материалы и методы**

Работу проводили на митохондриях 5 дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт и сорт Альфа.

Семена гороха промывали водой с мылом и 0,01% раствором  $\text{KMnO}_4$ . Контрольную группу семян в течение 30 мин замачивали в воде, а опытную группу – в  $10^{-9}$  М растворе N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП). 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 3-ОП, переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через 2 суток семена группы ДВ переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытной группы – на фильтровальную бумагу, увлажненную 3-ОП, 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, используя спектрофлуориметр «FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия) [Fletcher et al., 1973]. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

*Антирадикальную активность (АРА)* препарата оценивали хемилюминисцентным методом (ХЛ) по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (60 °С), которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила, (АИБИН). Интенсивность ХЛ усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу ингибирования  $k_{\text{INH}}$  рассчитывали из серии ХЛ кривых с разной концентрацией 3-ОП [Русина и др., 2005]. Полученные результаты соотносили с данными, полученными с использованием известных антиоксидантов  $\alpha$ -токоферола и хромана  $\text{C}_1$  (аналога  $\alpha$ -токоферола).

### **Результаты и обсуждение**

Дефицит воды приводил к активации свободнорадикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-

кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (рисунок).

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождались 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования (таблица).

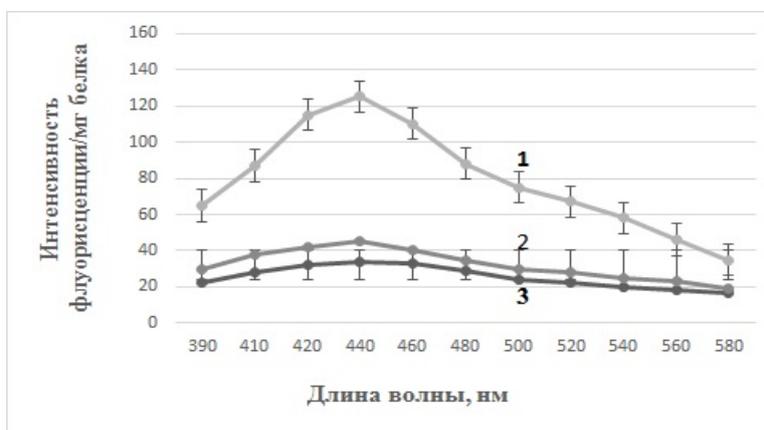


Рисунок. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридином (3-ОП). 1- ДВ; 2- ДВ+3-ОП; 3- контроль.

Таблица.

Влияние дефицита воды (ДВ) и N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП) на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха, нг-моль / (мг белка мин)

Группа	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	ДК	FCCP
Контроль	25,50±1,20	74,3±3,2	31,62±2,50	2,35±0,01	76,1±4,8
ДВ	15,0±2,10	45,6±2,5	27,27±1,00	1,65±0,02	52,0±2,2
ДВ+3-ОП (10 <sup>-9</sup> М)	26,8±2,34	76,5±2,6	30,36±1,32	2,52± 0,01	76,5±4,1

Среда инкубации: 0,4 М сахараза, 20 мМ HEPES-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, и 0,1% БСА, 10мМ малат, 10 мМ глутамат. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10<sup>-6</sup> М FCCP (карбонилцианид-р-трифторметоксифенил-гидразон).

При этом скорости окисления сукцината снижались всего на 10-15%. Введение в среду инкубации митохондрий 10 мкМ витамина К<sub>3</sub> почти восстанавливало скорости транспорта электронов на начальном участке дыхательной цепи, что свидетельствовало о снижении активности I комплекса дыхательной в условиях дефицита воды. Нарушение функционирования электрон-транспортной цепи митохондрий в условиях дефицита воды, возможно, обусловлено окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, и, следовательно, возможным снижением содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий [Paradies et al., 2004].

Обработка семян и проростков гороха 3-ОП предотвращала активацию ПОЛ в мембранах митохондрий (рисунок). Препарат, защищая от ПОЛ ненасыщенные ЖК, входящие в состав липидов мембран, способствовал сохранению высоких скоростей окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP и предотвращал снижение эффективности окислительного фосфорилирования, обусловленное дефицитом воды (таблица).

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразилось и на физиологических

показателях, а именно, на росте проростков. Водный дефицит резко снижал ростовые процессы. Обработка семян гороха 3-ОП предотвращала снижение темпа роста корней.

На основании приведенных данных можно прийти к заключению, что образование АФК при стрессе (дефиците воды) активирует перекисное окисление липидов мембран, что приводит к дестабилизации комплекса I, усилению генерации АФК и вероятно, диссоциации суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий [Genova, Lenaz, 2014]. Можно предположить, что защитный эффект препарата обусловлен его антирадикальными и антиоксидантными свойствами. Эффективная константа ингибирования свободнорадикального окисления этилбензола (60 °С) равна –  $3,84 \times 10^4$  (Мс)<sup>-1</sup>. Снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления находит отражение в низкой интенсивности ПОЛ. N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, предотвращая пероксидацию фосфолипидов, обеспечивает эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий за счет повышения активности НАД-зависимых дегидрогеназ. Результатом повышения активности этих ферментов является активация энергетических процессов в клетке, что повышает устойчивость растительного организма к изменяющимся условиям внешней среды.

#### Литература

Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Т.Г. Митохондрия как многоликий янус // Биохимия. – 2007. – Т. 72, №10. – С. 1371–1384.

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.

Русина И.Ф., Максимова Т.В., Кондратович В.Г., Ведутенко В.В., Касаикина О.Т. Кинетические модели для определения биоантиоксидантов // Сб. «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки». – Тюмень, 2005. – С. 46–49.

Шакирова Ф.М., Гилязетдинов Ш.Я., Кулаева О.Н. Стратегия использования регуляторов роста растений // Вестник академии наук Республики Башкортостан. – 2003. – Т. 8, № 1. – С.14–21.

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.

Atkin O.K., Macherel D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance // Ann. Bot. – 2009. – V.103. – P. 581–590.

Boyer J.S. Plant productivity and the environment // Science. – 1982. – V. 218. – P. 443–448.

Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes // BBA. – V. 1837, № 4. – P. 427–443.

Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in mitochondrial complex i activity in ischemic/perfused rat heart. involvement of reactive oxygen species and cardiolipin // Circulation Research. – 2004. – V. 94. – P. 53–59.

## THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA OF PEA SEEDLINGS UNDER CONDITIONS OF WATER DEFICIENCY

I.V. Zhigacheva<sup>1</sup>, I.F. Rusina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, *zhigacheva@mail.ru*

<sup>2</sup>Semenov Institute of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, *rusina939@mail.ru*

**Abstract.** Using the model of water deficiency (WD), the anti-stress properties of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine N-acetylcysteinate (3-OP) were studied. WD led to a 3-fold increase in the intensity of LPO in the membranes of mitochondria of etiolated pea seedlings and a 30% decrease in the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates.  $10^{-9}$  M 3-OP prevented the activation of LPO in mitochondrial membranes, which ensured efficient operation of the electron transport chain of mitochondria and increased the resistance of seedlings to WD.

**Keywords:** *3-hydroxypyridine derivatives, mitochondria, water deficiency*