

УДК 581.1.045:576.311.347.3:581.134

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВОДЫ И ОБРАБОТКИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ, ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМИ И ПРОИЗВОДНЫМ 5-ГИДРОКСИБЕНЗИМИДАЗОЛА

© 2017 г. И. В. Жигачева, В. И. Бинюков, Е. М. Миль

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля»

Российской академии наук

(Москва, Россия)

Исследовано влияние недостаточного увлажнения (НУ) и препаратов, относящихся к различным классам химических соединений: фосфорорганического соединения – мелафена (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты, амбиола (2-метил-4-диметиламинометил-бензилимидазол-5-ол-дигидрохлорида) и герматрана (1-(герматран-1-ил)-1 оксиэтиламина) на жирнокислотный состав мембран и энергетику митохондрий 6-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Показано, что недостаточное увлажнение приводило к изменениям в жирнокислотном (ЖК) составе мембран митохондрий. Коэффициент ненасыщенности ЖК, содержащих 18 и 20 атомов углерода атомов углерода, снижался в 1,5 и 3 раза соответственно. Изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий сопровождалось изменениями максимальных скоростей окисления НАДН-зависимых субстратов и скоростей транспорта электронов на терминальном участке дыхательной цепи. Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена или 2×10^{-5} М растворе герматрана предотвращало изменения биоэнергетических характеристик митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды. Обработка семян гороха 10^{-9} М амбиолом почти не оказывала защитного действия на биоэнергетические характеристики митохондрий проростков гороха. Предполагается, что различный характер влияния биологически активных соединений на функциональное состояние митохондрий обусловлен различием во влиянии исследуемых БАВ на ЖК состав мембран этих органелл.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, митохондрии, дефицит воды, пероксидное окисление липидов, активные формы кислорода, жирнокислотный состав мембран

Недостаток воды нарушает нормальную жизнедеятельность растений. Дефицит воды в первую очередь приводит к уменьшению в клетках свободной воды, что изменяет гидратные оболочки белков цитоплазмы и сказывается на функционировании белков-ферментов. В условиях водного дефицита тормозятся клеточное деление и особенно растяжение, что приводит к формированию мелких клеток. При резком недостатке воды в почве задерживается биосинтез органических соединений и усиливается гидролиз, в результате чего нарушаются

ростовые процессы (Хван, 1969). Растения, перенесшие сильную кратковременную засуху, так и не возвращаются к нормальному обмену веществ (Boyer, 1982).

Известно, что реализация антистрессовых программ требует больших энергетических затрат (Шакирова, 2001). Поэтому энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях организма. В своей работе мы обратили внимание главным образом на митохондрии, так как эти органеллы, как у растений, так и у животных играют одну из основных ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

Около 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате 1-2 -электронного восстановления образует активные формы кислорода (АФК), которые участвуют в клеточной редокс-сигнализации. В норме стационарный уровень АФК в органах и тканях весьма низок (порядка 10^{-10} - 10^{-11} М) за счет наличия в них ферментативной и неферментативной систем регуляции накопления и утилизации АФК. При длительном действии неблагоприятных факторов или сильном воздействии стрессового фактора происходит смещение про-/антиоксидантного равновесия в сторону увеличения продукции АФК митохондриями, что приводит к нарушению физиологических функций растительных организмов (угнетению ростовых процессов, снижению урожайности и т.д.). При этом митохондрии являются как источниками, так и мишенью АФК, способных ингибировать или снижать активность ферментов митохондрий, содержащих Fe-S-кластеры. При этом наиболее чувствительным к продуктам свободно радикальных реакций является I комплекс дыхательной цепи митохондрий (Sweetlove et al., 2002; Paradies, 2004).

Кроме того, взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран митохондрий, такими как линолевая и линоленовая кислоты, приводит к активации пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Образование в результате ПОЛ гидрофильных продуктов окисления изменяет структуру липидного бислоя мембран в гидрофобных участках. Перекисидация линолевой кислоты, входящей в состав кардиолипина, вызывает снижение содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий, (Genova, Lenaz, 2014) и окисление тиоловых групп белков. В результате происходит набухание митохондрий, выход цитохрома *c* и, возможно, индукция апоптоза (Kang et al., 1979; Vladimirov et al., 1980; Zhang, Li et al, 2009). Активация процессов ПОЛ может быть одной из причин утечки цитохрома *c* и нарушения электрон-транспортной функции цитохромоксидазного участка дыхательной цепи митохондрий (Scott, Logan, 2008; Кашуро и др., 2010).

Влияние дефицита воды, а также других стрессовых факторов, на растение может быть ослаблено или нивелировано обработкой синтетическими регуляторами роста и развития растений (РРР), которые оказывают стабилизирующее действие на биологические мембраны уменьшая их повреждение, либо восстанавли-

вая активность метаболических процессов (Калмыкова и др., 2012). В последние годы большое внимание уделяется синтезу и применению синтетических РРР, которые обладают не только ростостимулирующими, но и адаптогенными свойствами.

В связи с этим можно было предположить, что такие РРР могут повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов, влияя на генерацию АФК митохондриями. В качестве объектов исследования нами были выбраны препараты, относящиеся к различным классам химических соединений: фосфорорганическое соединение – мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты, производное 5-гидроксibenзимидазола – амбиол: (2-метил-4-диметиламинометил-бензил-имидазол-5-ол-дигидрохлорид) и трициклический германиевый эфир триэтанолamina – герматран 1-(герматран-1-ил)-1-оксиэтиламин, предотвращающие активацию ПОЛ в модельных экспериментах (Жигачева и др., 2008; Zhigacheva, Burlakova, 2014; Жигачева и др. 2015).

Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий (Шугаева и др., 2007), интересно было выяснить, как влияют эти РРР на функциональное состояние митохондрий проростков гороха, подвергнутых двухдневному действию недостаточного увлажнения.

МЕТОДИКА

В работе использовали 6-дневные проростки гороха (*Pisum sativum* L), сортов Флора 2 и Альфа. Семена гороха промывали водой с мылом и 0,01% раствором $KMnO_4$. Контрольную группу семян в течение 1 ч замачивали в воде, а опытную группу – в растворе исследуемых РРР: 2×10^{-12} М мелафена, 10^{-9} М амбиола и 10^{-5} М герматрана. Эти соединения в указанных концентрациях снижали интенсивность ПОЛ до контрольных значений (Zhigacheva, Burlakova, 2014). После обработки семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение 2 сут. Через 2 сут половину семян контрольной группы варианта с недостаточным увлажнением (НУ) и обработанные РРР на 2 сут переносили на сухую фильтровальную бумагу. Затем семена группы НУ и семена, обработанные РРР, переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих 2 сут. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 6 сут. На шестые сутки выделяли ми-

тохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков проводили методом дифференциального центрифугирования (Попов и др., 2003). Эпикотили гороха длиной 3-6 см гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей 0,4 М сахарозу, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ K_2HPO_4 (pH 8,0), 10 мМ KCl, 2 мМ дигиотреитол и 0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот (ЖК). Гомогенат центрифугировали при 25000 г в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 8 мл среды промывания и центрифугировали при 3000 г в течение 3 мин. Среда промывания содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ K_2HPO_4 (pH 7,4), 5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl и 0,2% БСА (свободный от ЖК). Надосадочную жидкость центрифугировали при 11000 г течение 10 мин, осаждая митохондрии. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ K_2HPO_4 (pH 7,4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии центрифугированием при 11000 г в течение 10 мин.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями осуществляли полярографическим методом, используя полярограф LP-7 (Чехия) и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7,2), 5 мМ K_2HPO_4 , 4 мМ MgCl_2 , и 0,1% БСА, 10 мМ малат, 10 мМ глутамат.

Уровень пероксидного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом (Fletcher et al., 1973). Липиды экстрагировали из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка, смесью хлороформ-метанол (2:1 по объему). Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол – 1:10. Митохондрии гомогенизировали в течение 1 мин в стеклянном гомогенизаторе объемом 2 мл при температуре 10°C, используя стеклянный пестик, затем к смеси добавляли равный объем дистиллированной воды, быстро смешивали и переносили в 12 мл центрифужные стаканы. (Промывание водой было необходимо для удаления флавиновых компонентов, имеющих максимум флуоресценции в области 520 нм). Центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Отбирали 3 мл нижнего (хлороформного) слоя и добавляли 0,3 мл метанола. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (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. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий (Carreau, Dubacq, 1979; Wang et al., 2000). 200 мкл митохондрий помещали в специальную пробирку с герметично закрывающейся пробкой, добавляли 5 мл метилового спирта и на 1 ч помещали в морозильную камеру. Затем в пробу добавляли 600 мкл ацетилхлорида и кипятили при перемешивании в течение 1 ч. Дополнительную очистку МЭЖК проводили с помощью тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинках с силикагелем КСК (Россия) (Воинов и др, 1967; Орел, 2007). МЭЖК экстрагировали гексаном, полученные растворы анализировали.

Идентификацию МЭЖК проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и по величинам индексов удерживания (Golovina, Kuzmenko, 1977). ГХ-МС осуществляли на хромато-масс-спектрометре Hewlett-Packard-6890 с масс-селективным детектором HP-5972. МЭЖК разделяли на капиллярной колонке HP-5MS (30 м × 0,25 мм, слой фазы 0,25 мкм) при программировании температуры от 60 до 285°C со скоростью 5°C/мин. Температура испарителя – 250°C, детектора – 280°C. Масс-спектры получали, в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 e.V. и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40-450 а.е.м.

Количественный состав МЭЖК определяли на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм). Анализ МЭЖК проводили при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия – 1,5 мл/мин. Каждая проба составляла 2 мкл гексанового экстракта. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали как отношение площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК.

Индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности липидов, вычисляли по формуле: $\text{ИДС} = \sum P_j n_j / 100$, где P_j – содержание ЖК (в %), n_j – количество двойных связей в каждой кислоте. Также использовали

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

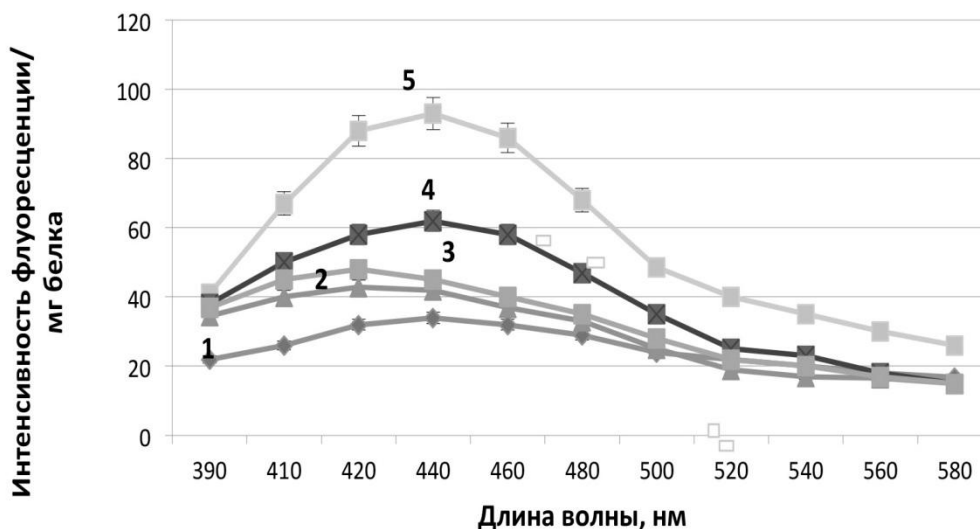


Рис. 1. Влияние недостаточного увлажнения (НУ), мелафена (МФ), герматрана (ГЕР) и амбиола (АМБ) на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха сорта Флора 2.

1 – контроль; 2 – НУ + МФ; 3 – НУ + ГЕР; 4 – НУ + АМБ; 5 – НУ.

коэффициент ненасыщенности (К) как отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК.

Образцы митохондрий для атомно-силовой микроскопии (АСМ) готовили на полированной силиконовой подложке перед воздушной сушкой митохондрии на подложке фиксировали 2% глутаровым альдегидом в течение 2 мин. с последующей промывкой водой. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме, использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10 нм. Некоторые геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя Image Analysis. Сечение производили на высоте 30 нм. Объем имиджа митохондрий исследуемых препаратов митохондрий соответствовал произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$.

Реактивы: карбонат калия, метанол (Merck, Германия), гексан (Panreac, Испания), хлористый ацетил (Acros, Бельгия), сахароза, Трис, FCCP малат, глутамат, рогенон, антимицин А, N,N, N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД), аскорбат (Sigma Aldrich, США),

БСА (свободный от жирных кислот) (Sigma, США), NERES (MP Biomedicals, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Недостаточное увлажнение вызывало активацию свободнорадикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (рис. 1).

Полученные результаты согласуются с литературными данными по влиянию дефицита воды на активацию свободнорадикального окисления в мембранах проростков пшеницы (Selote et al., 2004; Miller et al., 2010). Отметим, что обработка семян гороха исследуемыми РРР приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ. При этом наиболее эффективным был мелафен и наименее эффективным амбиол.

Активация ПОЛ, возможно, могла привести к изменению в жирнокислотном составе мембран. В связи с этим в следующих сериях экспериментов изучали влияние недостаточного увлажнения и РРР на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран митохондрий. Дефицит воды вызывал увеличение относительного содержания насыщенных и уменьшение содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК) в мембранах митохондрий проростков гороха. При этом значительные из-

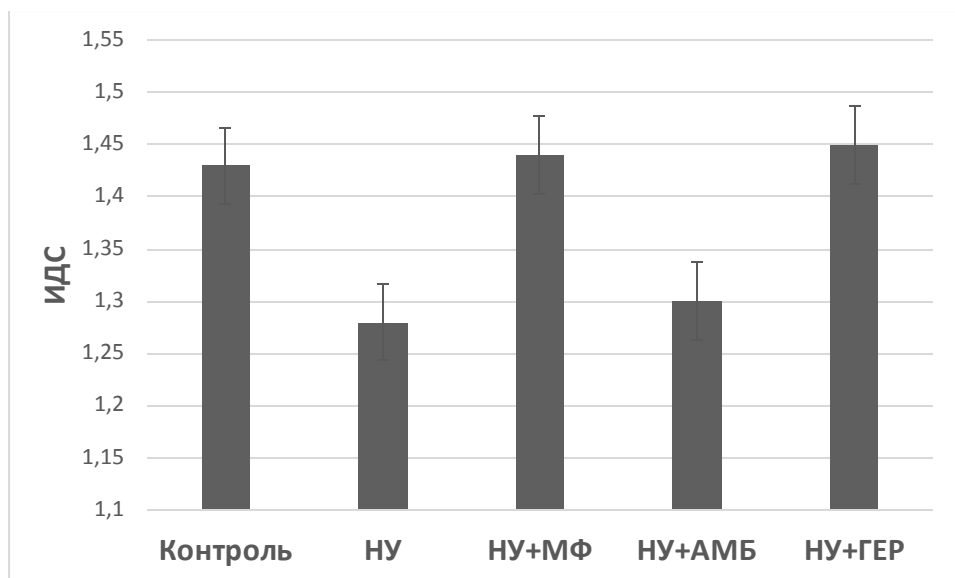


Рис. 2. Влияние недостаточного увлажнения и регуляторов роста растений на индекс двойных связей (ИДС) ЖК, содержащих 18 атомов углерода, в липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха сорта Флора 2.

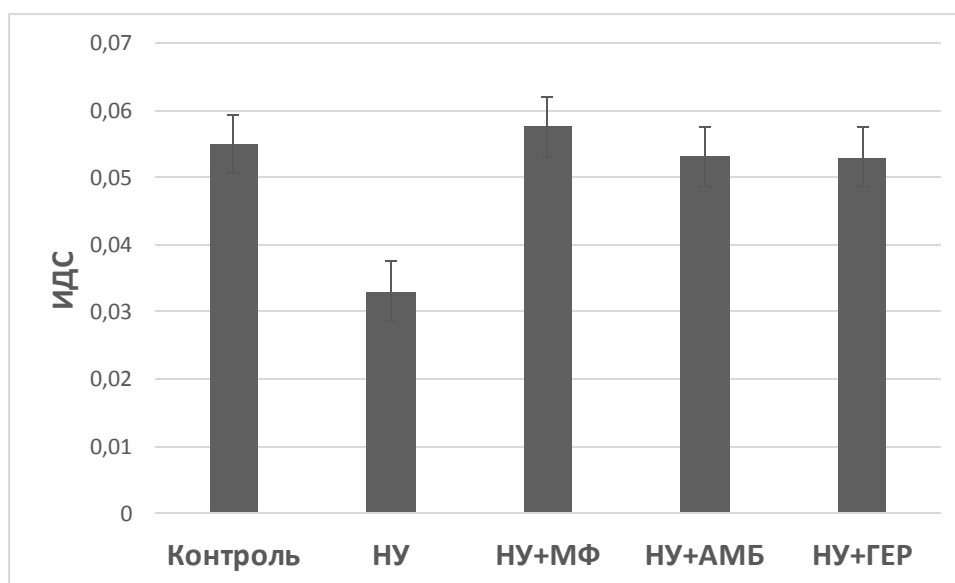


Рис. 3. Влияние недостаточного увлажнения и регуляторов роста растений на индекс двойных связей (ИДС) ЖК, содержащих 20 атомов углерода, в липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха сорта Флора 2.

менения наблюдались в содержании жирных кислот с 18 атомами углерода. Содержание линолевой кислоты снижалось на 11%, линоленовой – на 19%, а содержание стеариновой кислоты возрастало на 41%. При этом индекс двойных связей ЖК, содержащих 18 атомов углерода, снижался с $1,45 \pm 0,02$ до $1,28 \pm 0,01$ (рис. 2), а коэффициент ненасыщенности жирных кислот, содержащих 18 атомов углерода, уменьшался с $23,54 \pm 0,07$ до $15,15 \pm 0,22$.

Изменение содержания жирных кислот с 18 атомами углерода вследствие действия обезвоживания наблюдались также в мембранах митохондрий кукурузы, клеток картофеля, мембранах из листьев *Arabidopsis thaliana* и абрикоса (Leone et al., 1996; Guo, Li, 2002; Gigon et al., 2004). При этом авторы отмечали значительное снижение содержания линолевой и линоленовой кислот и увеличение содержания стеариновой кислоты. Существенные измене-

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

Таблица 1. Влияние недостаточного увлажнения (НУ), мелафена (МФ), амбиола (АМБ) и герматрана (ГЕР) на скорости окисления НАДН-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха сорта Флора 2, нг-моль/(мг белка мин) (данные 10 экспериментов)

Группа	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	ДК	ФССТ
Контроль	20,0±2,5	70,0±5,4	30,0±2,0	2,33±0,01	72,0±5,0
НУ	11,8±1,9	47,6±3,2	38,2±1,0	1,25±0,02	49,9±4,8
НУ+МФ (2×10 ⁻¹² М)	20,8±2,1	69,0±4,4	28,1±1,3	2,46± 0,03	70,2±3,8
НУ+Гер (2× 10 ⁻⁵ М)	19,5±1,4	71,0±3,1	28,4±2,13	2,50±0,04	78,0±6,4
НУ+АБ (10 ⁻⁹ М)	17,6±2,0	52,8±2,1	27,0±2,1	1,96±0,03	57,1±4,4

Примечание. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10⁻⁶ М ФССТ (карбонилцианид-*p*-трифторметоксифенил-гидразон).

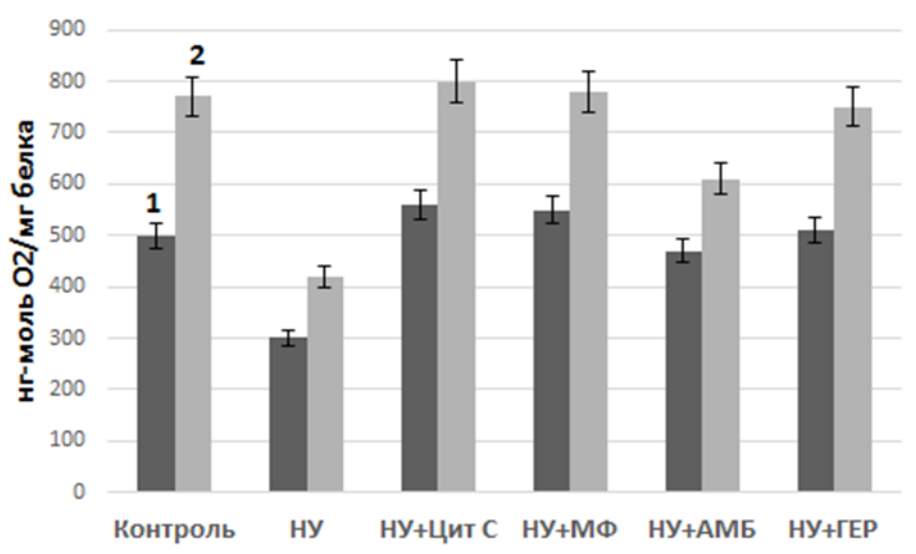


Рис. 4. Скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД митохондриями проростков гороха (сорт Альфа).

1 – 400 мкМ ТМФД (N,N,N',N'-тетраметил - *p*-фенилендиамин); 2 – 600 мкМ цитохром *c* добавляли в среду инкубации в концентрации 5×10⁻⁶ М. Среда инкубации содержала: 0,4 М сахара, 10 мМ аскорбат, 60 мкМ ротенон, 5 мкМ антимидин А, 0,5 мкМ ФССТ (карбонилцианид-*p*-трифторметоксифенил-гидразон).

ния наблюдались и в относительном содержании жирных кислот с 20 углеродными атомами. Так же как и в случае с С₁₈ ЖК, содержание ненасыщенных ЖК уменьшалось, а содержание насыщенных ЖК – увеличивалось: индекс двойных связей снизился с 0,0555±0,001 до 0,0331±0,001 (рис. 3), а коэффициент ненасыщенности ЖК, содержащих 20 атомов углерода, уменьшился с 3,65 ± 0,03 до 1,20 ± 0,16.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, вероятно, могли привести к изменениям липид-белковых взаимодействий, а, следовательно, и активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, дефицит воды вызывал 40% снижение максимальных скоростей окисления НАДН-зависимых субстратов и 30% снижение вели-

чины дыхательного контроля при окислении этих субстратов митохондриями проростков гороха (табл. 1).

При этом скорости окисления сукцината снижались всего на 10-15%. Введение в среду инкубации митохондрий 10 мкМ витамина К₃ почти восстанавливало скорости транспорта электронов на начальном участке дыхательной цепи, что свидетельствует о снижении активности I комплекса дыхательной цепи 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 фос-

Таблица 2. Влияние дефицита воды, мелафена (2×10^{-12} М) или герматрана (10^{-5} М) на объем (V) АСМ-имиджей митохондрий проростков гороха сорта Флора 2

Группа	Среднее значение V, $(\mu\text{м})^2 \times \text{nm}$	95%	-95%
Контроль	81,05	92,11	69,99
НУ + МФ	86,43	94,51	78,38
НУ	115,13	127,23	103,03
НУ + ГЕР	87,7	95,79	79,6

фолипида во внутренней мембране митохондрий (Paradies et al., 2004). Подтверждением этому предположению является 2-кратное снижение скоростей транспорта электронов на конечном цитохромоксидазном участке дыхательной цепи митохондрий проростков гороха, находящихся в условиях дефицита воды (рис. 4).

Введение в среду инкубации этих митохондрий, 5×10^{-6} М цитохрома *c* приводило к восстановлению скоростей окисления пары аскорбат + ТМФД до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома *c*, обусловленной окислением кардиолипина во внутренней мембране этих органелл. В пользу данного предположения также свидетельствуют и данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ имиджи митохондрий проростков гороха, подвергшихся двухдневному водному дефициту, существенно изменялись и отличались от контрольных образцов. Статистический анализ объема предварительно фиксированных глутаровым альдегидом митохондрий свидетельствует о появлении одиночных, не делящихся митохондрий большего объема в группе проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о набухании митохондрий (табл. 2).

Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена или 2×10^{-5} М растворе герматрана предотвращало изменения морфологии митохондрий. Размеры митохондрий приближались к контрольным. При этом происходило снижение содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня. Такая обработка предотвращала изменения эффективности окислительного фосфорилирования, обусловленное дефицитом воды, и способствовала сохранению высоких скоростей окисления НАДН-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP. Отметим, что обработка семян гороха 10^{-9} М амбиолом, который слабее влиял на интенсивность

ПОЛ в условиях недостаточного увлажнения, почти не оказывала воздействия на биоэнергетические характеристики митохондрий проростков гороха. Максимальные скорости окисления НАДН-зависимых субстратов в присутствии АДФ и FCCP мало отличались от этих показателей у проростков гороха, находящихся в условиях недостаточного увлажнения. Однако эффективность окислительного фосфорилирования увеличивалась: с $1,25 \pm 0,02$ (НУ) до $1,96 \pm 0,02$ (НУ+АБ) (табл. 1). Изменения биоэнергетических характеристик митохондрий, по-видимому, связаны с физико-химическим состоянием мембран этих органелл. Мелафен и герматран, предотвращая окисление ненасыщенных C_{18} ЖК, главным образом линолевой кислоты (рис. 2), которая является одной из основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивали эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий, вероятно, обусловленное формированием суперкомплексов дыхательных переносчиков (Paradies et al., 2004). Амбиол почти не влиял на окисление C_{18} ЖК в условиях дефицита воды, но предотвращал окисление C_{20} -ненасыщенных ЖК в мембранах митохондрий проростков гороха (рис. 3), что, очевидно, сказалось на эффективности окислительного фосфорилирования.

Известно, что проростки гороха, особенно чувствительны к недостатку влаги. Ранее было показано, что начальные стадии роста проростков более чувствительны к дефициту воды, чем последующие (Генерозова, Шугаев, 2012). В наших экспериментах мы использовали наиболее чувствительные к недостатку влаги двухдневные проростки. Недостаточное увлажнение ингибировало рост проростков (рис. 5), что согласуется с литературными данными. Обработка семян гороха амбиолом, герматраном и мелафеном, предотвращала торможение роста корней в условиях недостаточного увлажнения. При этом длина корней проростков, обработанных мелафеном, была даже в 1,5 раза больше, чем у контрольных образцов. Отметим, что амбиол почти не оказывал влияния

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

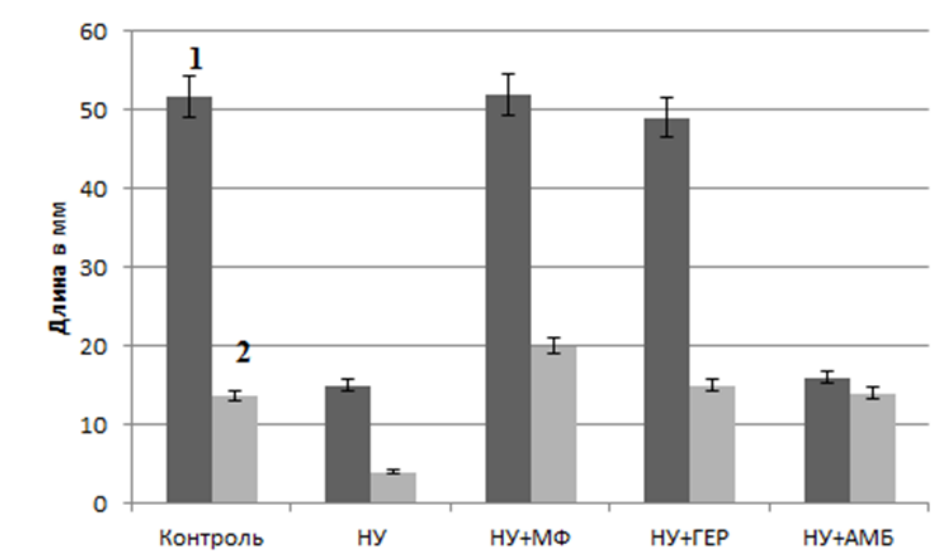


Рис. 5. Влияние недостаточного увлажнения, мелафена (МФ), герматрана (ГЕР) и амбиола (АМБ) на рост побегов (1) и корней (2) проростков гороха сорта Флора 2 .

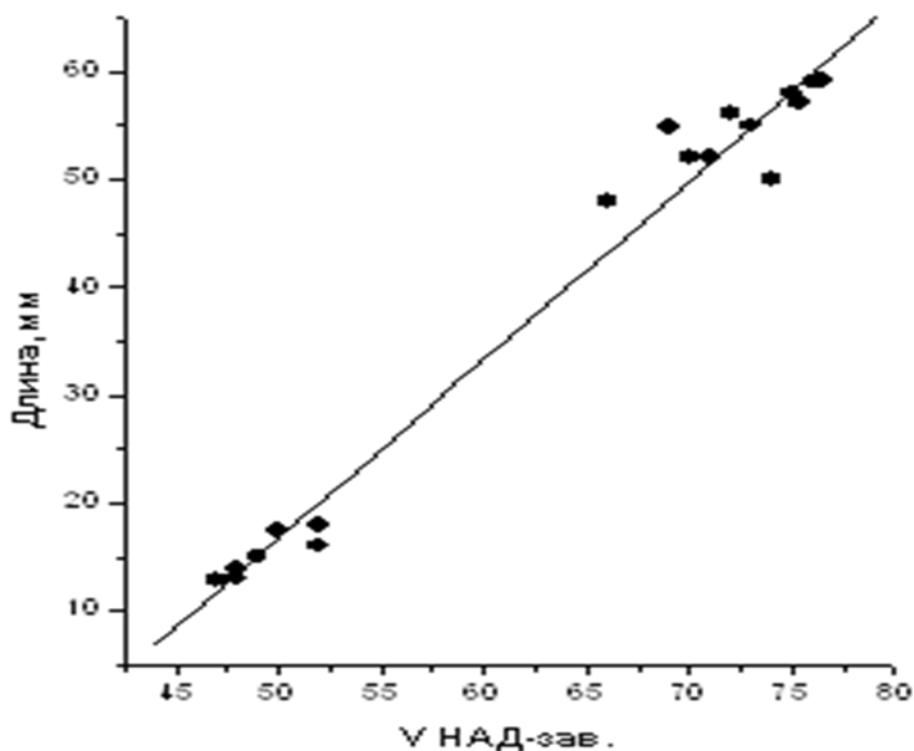


Рис. 6. Корреляция между длиной побегов проростков гороха сорта Флора 2 и скоростями окисления НАДН-зависимых субстратов в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования.

По оси абсцисс – максимальные скорости окисления в нг-моль O_2 /мг белка \times мин., по оси ординат – длина побегов в мм. $Y = - 66,04 + 1,66x$; $r = 0,9316$. Уровень достоверности 95%.

на рост побегов, в то время как мелафен и герматран предупреждали торможение роста побегов в условиях дефицита воды.

Такое различие во влиянии исследуемых РРР на ростовые процессы, по-видимому, связано с различием в содержании ЖК в составе

мембран митохондрий проростков гороха, обработанных мелафеном, герматраном или амбиолом. Действительно, между длиной побегов и максимальными скоростями окисления НАДН-зависимых субстратов, а, следовательно, и коэффициентом ненасыщенности C_{18} ЖК, наблюдалась тесная корреляция с коэффициентом корреляции 0,9316 (рис. 6). В то же время между коэффициентом ненасыщенности C_{20} ЖК и длиной корней проростков также наблюдалась тесная корреляция с коэффициентом 0,9491 (данные не представлены).

На основании полученных данных можно предположить, что устойчивость растений к водному стрессу определяется антиоксидантной системой клетки, предотвращающей окисление ненасыщенных жирных кислот, содержащих 18 и 20 углеродных атомов. Отметим, что митохондрии прорастающих семян характеризуются относительно низкими скоростями окисления НАДН-зависимых субстратов. Увеличение активности НАДН-зависимых дегидрогеназ активирует энергетические процессы в клетке, что повышает устойчивость растительного организма к изменяющимся условиям окружающей среды (Koster et al., 2003).

Можно предположить, что слабый защитный эффект амбиола в отношении комплекса I дыхательной цепи митохондрий в условиях недостаточного увлажнения связан с окислением ненасыщенных жирных кислот с 18 атомами углерода, главным образом линолевой кислоты, входящей в состав кардиолипина, в мембранах митохондрий проростков гороха. Его защитное действие в условиях дефицита воды, вероятно, обусловлено предотвращением окисления жирных кислот, имеющих 20 атомов углерода.

Необходимо отметить, что в настоящее время существует множество гипотез относительно механизмов влияния малых и сверхмалых концентраций БАВ. Поскольку амбиол и герматран использовались нами в области так называемых физиологических концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М), то можно предположить, что в этой концентрации исследуемые препараты неспецифически встраивались в мембраны митохондрий и взаимодействовали с окружающими фосфолипидами (Пальмина, 2009). Что же касается мелафена, то он использовался в сверхмалой концентрации (2×10^{-12} М). По нашему мнению, результаты, полученные для мелафена могут быть интерпретированы с точки зрения физико-химического поведения сильно разбавленных растворов препаратов. По данным

И.С. Рыжкиной (2009), мелафен в концентрации 10^{-18} - 10^{-4} моль/л образует наноассоциаты с участием воды размером около 200 нм. Концентрационные зависимости, полученные Коноваловым А.И. и его сотрудниками для размеров и электрогидравлического кинетического потенциала (ζ -потенциала) наноассоциатов, образованных в водных растворах мелафена при низких и сверхнизких концентрациях (Рыжкина и др., 2009), сравнимы с биологическим действием препарата, как описано в этой работе и других публикациях (Жигачева и др., 2007; Zhigacheva et al, 2014), что свидетельствует о возможной роли наноассоциатов мелафена в проявлении его биологических эффектов.

ЛИТЕРАТУРА

- Воинов Н.А., Т.Г. Волова-Алимова Е.К, Аствацатурьян А.Т. Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии. – М.: Медицина, 1967 – 289 с.
- Генерозова И.П., Шугаев А.Г. Дыхательный метаболизм митохондрий проростков гороха разного возраста в условиях недостатка влаги и реводнения // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, №2. – С. 262-273.
- Жигачева И.В., Бинюков В.И., Миль Е.М, Генерозова И.П., Расулов М.М. Влияние германийорганического соединения на функциональное состояние митохондрий растительного и животного происхождения // Научный альманах – 2015. – Т. 7, № 9. – С. 955-966.
- Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Бурлакова Е.Б., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г, Коновалов А.И. Влияние фосфорорганического регулятора роста растений на структурные характеристики мембран растительного и животного происхождения // Биол. мембраны. – 2008 – Т. 25, № 2. – С. 128-134.
- Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Русина И.Ф., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Антистрессовые свойства препарата мелафен // Докл. АН [Россия]. – 2007. – Т. 414, № 2. – С. 263-265.
- Калмыкова Т.С., Лукатин А.С., Духовик П., Куликова Н.Н. Эффект препарата силк в условиях комплексного температурного и водного стрессов на растения томатов // С.-х биология. – 2012. – № 1. – С. 86-91.
- Кашуро В.А, Долго-Сабуров В.Б., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Лапина Н.В. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии // Фармакология. – 2010. – Т. 11. – С. 611-634.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

- Орел Н.М. Биохимия липидов. – Минск: БГУ, 2007. – 35 с.
- Пальмина Н.П. Механизм действия сверхмалых доз // Химия и жизнь. – 2009. – № 2. – С. 10-13.
- 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.
- Рыжжина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Коновалов А.И. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ // Докл. АН [Россия]. – 2009. – Т. 428, № 4. – С. 487-491.
- Хван А.В. Влияние недостаточного и избыточного увлажнения почвы на некоторые физиологические показатели и урожай сои // Вопросы биологии. – Благовещенск, 1969. – С. 104-116.
- Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
- 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.
- Boyer J.S. Plant productivity and the environment // Science. – 1982. – V. 218. – P. 4430-4448.
- Sweetlove L.J., Heazlwood J.L., Hearld V., Holtzapffel R., Day D.A., Leaver C.J., Millar A.H. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria // Plant J. – 2002. – V. 32. – P. 891-904.
- Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // J. Chromatogr. – 1979. – V. 151. – P. 384-390.
- 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.
- Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1837. – P. 427-443.
- Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A.T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia) // Ann. Bot. – 2004. – V.94, № 3, – P. 345-351.
- Golovina R.V., Kuzmenko T.E. Thermodynamic evaluation interaction of fatty acid methyl esters with polar and nonpolar stationary phases, based on their retention indices chromatographia // Chromatogr. – 1977. – V.10. – P. 545-546.
- Guo Y.P., Li J.R. Changes of Fatty Acids composition of membrane lipids, ethylene release and lipoxygenase activity in leaves of apricot under drought // J. Zhejiang Univ (Agric. Life Sci). – 2002. – V. 28. – P. 513-517.
- Kang S.Y., Gutowsky H.S., Hsung J.C., Jacobs R., King T.E., Rice D., Oldfield E. Nuclear magnetic resonance investigation of the cytochrome oxidase-phospholipid interaction: a new model for boundary lipid // Biochemistry. – 1979. – V. 18. – P. 3257-3267.
- Koster K.L., Reisdorph N., Ramsau J.L. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54. – P. 1607-1614.
- Leone A., Costa A., Grillo S., Tucci M., Horvarth I., Vigh L. Acclimation to low water potential determines changes in membrane fatty acid composition and fluidity in potato cells // Plant Cell Environ. – 1996. – V. 19. – P. 1103-1109.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // Plant Cell Environ. – 2010. – V. 33. – P. 453-467.
- 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 // Circul. Res. – 2004. – V. 94. – P. 53-59.
- Scott I., Logan D.C. Mitochondria and cell death pathways in plants // Plant Signal Behav. – 2008 – V. 3 – P. 475-477.
- Selote D.S., Bharti S., Khanna-Chopra R. Drought acclimation reduces O₂^{•-} accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 314. – P. 724-729.
- Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Chermisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane // Adv. Lipid Res. – 1980. – V. 17. – P. 173-249.
- Wang J., Sunwoo H., Cherian G., Sim I.S. Fatty acid determination in chicken egg yolk. A comparison of different methods poultry // Science. – 2000. – V. 79. – P. 1168-1171.
- Zhang L., Li Y., Xing D., Gao C. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in Arabidopsis // J. Exp. Bot. – 2009 – V. 60. – P. 2073-2091.
- Zhigacheva I.V., Burlakova E.B. Chapter 13. Adaptogenes and plant growth regulators decrease the generation of ROS in mitochondria // Chemistry and Physics of Complex Material. – London; New-York: Apple Academic Press, 2014 – P. 466-482.

Zhigacheva I., Mil' E., Binukov V., Generozova I., Shugaev A., Fatkullina L. Combined effect of insufficient watering, moderate cooling, and organophosphorous plant growth regulator on the morphology

and functional properties of pea seedling mitochondria // Ann. Res. Rev. Biol. – 2014 – V. 4. – P. 3007-3025.

Поступила в редакцію
15.12.2016 з.

MITOCHONDRIA FUNCTIONAL STATE OF PEA SEEDLING IN CONDITIONS OF WATER DEFICIT AND TREATMENT WITH PLANT GROWTH REGULATORS

I. V. Zhigacheva, V. I. Binukov, E. M. Mil'

*Institute for Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences
(Moscow, Russia)*

E-mail: zhigacheva@mail.ru

In the present work the effects of insufficient watering (IW) and drugs belonging to different classes of chemical compounds, namely organophosphorous compound melaphen (melamine salt of bis (oxymethyl) phosphinic acid), ambiol (2-methyl-4-dimethylamino-methyl-benzimidazole-5-ol-dihydrochloride) and germatran (1-(germatran-1-yl)-1 acetylamine) upon fatty acid (FA) composition of membranes and bioenergetics of mitochondria in 6-days etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L) were investigated. It was shown that IW leads to changes in the composition of FA in mitochondrial membranes. The coefficient of unsaturation of FA containing 18 carbon atoms was reduced in 1.5 times, and the one of FA containing 20 carbon atoms – in 3 times. Changes in the fatty acid composition of mitochondrial membranes were accompanied by changes in the maximum rates of oxidation of NADH-dependent substrates and electron transport rates on the terminal part of the respiratory chain. Soaking of seeds in 2×10^{-12} M solution of melaphen or 2×10^{-5} M solution of germatran prevented changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria in pea seedlings under conditions of water deficit. Pea seeds treatment with 10^{-9} M ambiol almost did not exert a protective action on the bioenergetic characteristics of mitochondria in sprouts. It is assumed that the different character of the biologically active compounds influence on the functional state of mitochondria depends on the difference in effects of the studied biologically active substances on the composition of fatty acids in membranes of these organelles.

Key words: *Pisum sativum, mitochondria, water deficit, lipid peroxidation, reactive oxygen species, membrane fatty acid composition*

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ ЗА УМОВ ДЕФЦИТУ ВОДИ І ОБРОБКИ ФОСФОРОРГАНІЧНИМИ, ГЕРМАНІЙОРГАНІЧНИМИ СПОЛУКАМИ ТА ПОХІДНИМИ 5-ГІДРОКСИБЕНЗІМІДАЗОЛУ

І. В. Жигачова, В. І. Бінюков, Є. М. Міль

*Федеральна державна бюджетна установа науки
«Інститут біохімічної фізики ім. Н.М. Емануєля»*

*Російської академії наук
(Москва, Росія)*

E-mail: zhigacheva@mail.ru

Досліджено вплив недостатнього зволоження (НЗ) і препаратів, що належать до різних класів хімічних сполук: фосфорорганічної сполуки – мелафену (меламінова сіль біс (оксиметил)-фосфінової кислоти), амбіолу (2-метил-4-диметиламінометил-бензілімідазол-5-ол-дигідрохлориду) і герматрану (1- (герматран-1-іл) -1 оксиетиламіну) на жирнокислотний склад мембран і енергетику мітохондрій 6-денних етіольорованих проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Показано, що недостатнє зволоження призводило до змін жирнокислотного (ЖК)

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ

складу мембран мітохондрій. Коефіцієнт ненасиченості ЖК, що містять 18 і 20 атомів вуглецю, знижувався в 1,5 і 3 рази відповідно. Зміна ЖК складу мембран мітохондрій супроводжувалася змінами максимальних швидкостей окиснення НАДН-залежних субстратів і швидкостей транспорту електронів на термінальній ділянці дихального ланцюга. Замочування насіння у 2×10^{-12} М розчині мелафену або 2×10^{-5} М розчині герматрану запобігало зміни біоенергетичних характеристик мітохондрій проростків гороху в умовах дефіциту води. Обробка насіння гороху 10^{-9} М розчином амбіолу майже не чинила захисної дії на біоенергетичні характеристики мітохондрій проростків гороху. Висловлено припущення, що різний характер впливу біологічно активних сполук на функціональний стан мітохондрій зумовлений різницею у впливі досліджуваних БАР на ЖК склад мембран цих органел.

Ключові слова: *Pisum sativum*, мітохондрії, дефіцит води, пероксидне окиснення ліпідів, активні форми кисню, жирнокислотний склад мембран