

УДК 616.153: 576.311.347.4: 615.277.3

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ И УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К ДЕФИЦИТУ ВОДЫ

© 2019 г. И. В. Жигачева¹, В. И. Бинюков¹,
Е. М. Миль¹, И. Ф. Русина²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН»
(Москва, Россия)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН»
(Москва, Россия)

Исследовали возможность использования производного 3-гидроксипиридина N-ацетилцистеинат-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП) в качестве стресс-протектора растений. Работу проводили, используя модель «старения» митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Инкубация митохондрий в гипотонической среде активировала пероксидное окисление липидов (ПОЛ): интенсивность флуоресценции продуктов увеличивалась в 5 раз по сравнению с контролем. 3-ГП в концентрациях от 10^{-14} до 10^{-5} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до уровня контрольных значений. Дефицит воды, вызывающий ПОЛ, снижал максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов и сукцината, а также скорости транспорта электронов на конечном (цитохромоксидазном) участке дыхательной цепи. Кроме того, водный дефицит вызывал набухание митохондрий. Введение в среду инкубации митохондрий цитохрома *c* в концентрации 5×10^{-6} М или обработка семян и проростков гороха 3-ГП 10^{-13} М либо 10^{-6} М восстанавливали скорости переноса электронов на этом участке дыхательной цепи. 3-ГП, ингибируя ПОЛ, способствовал сохранению функционального состояния митохондрий, что отразилось на физиологических показателях: препарат уменьшал эффект угнетения роста проростков гороха в условиях дефицита воды.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, производные 3-гидроксипиридина, митохондрии, активные формы кислорода, пероксидное окисление липидов, дефицит воды

Известно, что адаптация растений к изменяющимся условиям среды требует больших энергетических затрат. Поэтому, энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях. Митохондрии, являясь одним из центральных звеньев энергетического обмена, вносят значительный вклад в ответы организма на стрессовые воздействия. Изменения в окружающей среде приводят к структурно-функциональным перестройкам митохондрий,

обеспечивающим адаптацию организма к этим условиям (Роров, 2003; Grabelnych et al., 2004). Однако при сильных или длительных стрессовых воздействиях эти органеллы становятся одним из основных источников избыточной генерации активных форм кислорода (АФК) (Plotnikov et al., 2008). Накопление H_2O_2 в митохондриях может привести к образованию $OH\cdot$ в реакции Фентона (Halliwell, Gutteridge, 1989). Взаимодействие $OH\cdot$ с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран, может вызывать активацию пероксидного окисления липидов (ПОЛ). При этом может нарушаться осмо-

Адрес для корреспонденции: Жигачева Ирина Валентиновна, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия;
e-mail: zhigacheva@mail.ru

тический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. Вследствие этого происходит набухание митохондрий, результатом которого может быть высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза (Vladimirov et al., 1980; Munoz-Pinedo et al., 2006; Рязанцева и др., 2009).

Антиоксиданты, действующие в митохондриях, могут играть роль адаптогенов. В качестве объекта исследования нами были выбраны производные 3-оксипиридина (3-ОП). Интерес к изучению биологической активности производных 3-ОП обусловлен тем, что они являются структурными аналогами соединений группы витамина В₆, играющими важную роль в жизнедеятельности организма и выполняющими в нем роль физиологических антиоксидантов. Отмечено, что производные 3-ОП в концентрациях 10⁻⁶-10⁻⁴ М активно реагируют с гидроксильными радикалами, первичными свободными радикалами белков и пероксидными свободными радикалами (Харитонов, 2005; Чет, 2010). Они могут ингибировать ферментативное и неферментативное ПОЛ, а также оказывать влияние на активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы – СОД, каталазы) (Микуляк, 2010).

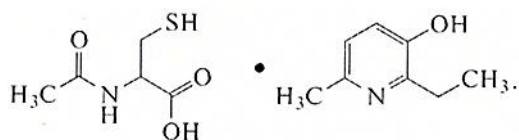


Рис. 1. N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП).

Целью работы было исследование влияния нового синтезированного водорастворимого соединения N-ацетилцистеината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП) (рис. 1), являющееся производным 3-оксипиридина, на процессы ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха. Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность как хлоропластов, так и митохондрий (Шугаева и др., 2007), интересно было выяснить, как влияет 3-ГП на функциональное состояние митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды.

МЕТОДИКА

Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростках гороха

(*Pisum sativum* L), сорта Альфа. Семена гороха промывали водой с мылом и 0,01% раствором КМnO₄. Контрольную группу семян в течение 1 ч замачивали в воде, а опытную группу – в 10⁻¹³ или 10⁻⁶ М растворе 3-ГП. Растворы N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина получали путем последовательных серийных десятичных разбавлений исходного раствора препарата (10⁻² М) с использованием свежеприготовленной бидистиллированной воды. Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. После этого половину семян контрольной группы и семена, обработанные 3-ГП, на двое суток переносили на сухую фильтровальную бумагу, создавая эффект дефицита воды. По прошествии двух суток необработанные препаратом семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытных групп – на фильтровальную бумагу, увлажненную 3-ГП еще на двое суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение пяти суток. На пятые сутки выделяли митохондрии 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 КН₂РО₄ (рН 8,0), 10 мМ КСl, 2 мМ дитиоэритритол и 0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот (ЖК). Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 8 мл среды содержащей 0,4 М сахарозу, 20 мМ КН₂РО₄ (рН 7,4), 5 мМ ЭДТА, 10 мМ КСl и 0,2% БСА и центрифугировали при 3000 g в течение 3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ КН₂РО₄ (рН 7,4), 0,1% БСА и вновь осаждали митохондрии при 11000 g 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 НЕРЕС-Tris-буфер (рН 7,2), 5 мМ КН₂РО₄, 4 мМ MgCl₂ и 0,1% БСА.

Уровень перексидного 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 составляла 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Антирадикальную активность (АРА) препарата оценивали хемилюминисцентным методом (ХЛ) по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (RH), которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила АИБИН (60°C). Интенсивность ХЛ усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу k_{inh} рассчитывали из серии ХЛ кривых с разной концентрацией N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП) (Русина и др., 2013). Результаты соотносили с данными, полученными с использованием известных антиоксидантов дибурола и хромана С1 (аналога α -токоферола).

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, использовали 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 соответствовал произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения.

На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Реактивы: Сахароза, ротенон, ангимицин А, N,N,N',N'-тетраметил-р-фенилендиамин (ТМФД), аскорбат, БСА (Sigma-Aldrich, США), FCCP (карбонилцианид-р-трифторметоксибензил-гидразон), KCl, 1,4-

дитио-dl-тритол (Fluka, Германия), NEPES (4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота) (Biochemica Ultra, для молекулярной биологии), Трис (гидроксиметил) аминотетан (Fluka, Германия), хлороформ, метанол (Merck, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для антиоксидантов, как и для других природных и синтетических биологически активных веществ необходим подбор наиболее эффективных концентраций, обеспечивающих повышение устойчивости и растительных организмов к стрессовым воздействиям, который обычно осуществляется на модельных системах. Поскольку в условиях стресса одним из источников АФК являются митохондрии, необходимо было разработать модель имитирующую стресс, то есть найти условия, при которых увеличивается продукция АФК митохондриями, а, следовательно, активируется ПОЛ (Pryor, Porter, 1990). Эту задачу решили с использованием модели «старения» (инкубация митохондрий в гипотонической среде, содержащей 1 мМ KH_2PO_4), что позволило определить концентрации 3-ГП, снижающие генерацию АФК митохондриями и, следовательно, предотвращающие активацию ПОЛ (Zhigacheva et al., 2015).

«Старение» приводило к увеличению интенсивности ПОЛ, что нашло отражение в пятикратном повышении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий проростков гороха (рис. 2).

Введение 3-ГП в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и имело дозозависимость. Препарат 3-ГП в концентрационном интервале от 10^{-14} до 10^{-5} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Можно предположить, что 3-ГП обладает и антирадикальной активностью. Действительно, полученные значения константы ингибирования свободнорадикального окисления (k_{inh}) 3-ГП и стехиометрического коэффициента ингибирования (f) по сравнению с известными антиоксидантами свидетельствуют о высокой антирадикальной активности препарата (табл. 1).

Выявленные зависимости действия препарата в низких и сверхнизких концентрациях качественно сопоставимы с ранее опубликованными данными о действии растворов биологически активных веществ, в том числе и анти-

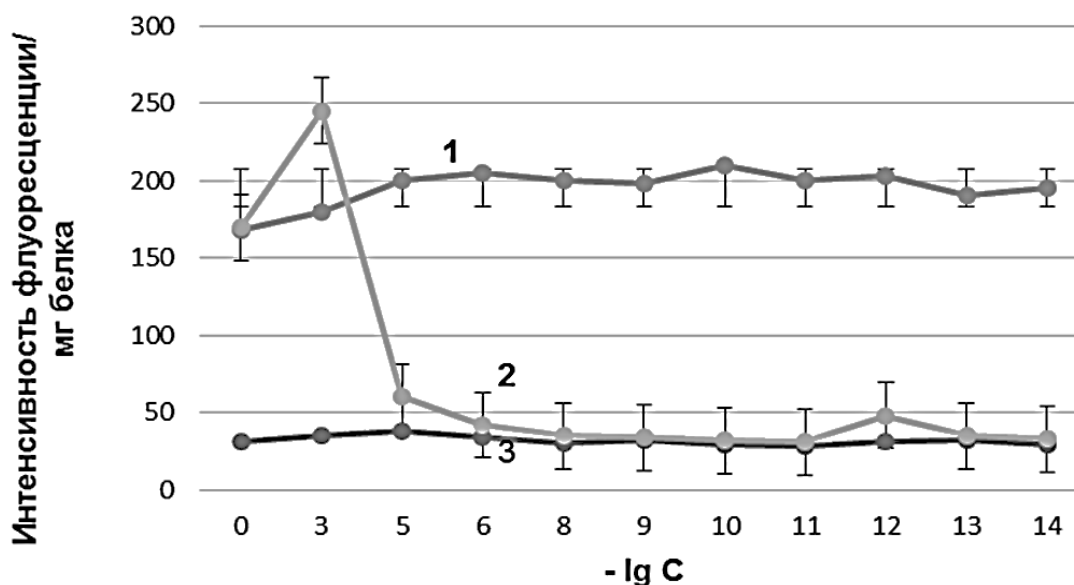


Рис. 2. Влияние различных концентраций 3-ГП и «старения» митохондрий на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ.

1 – «старение» митохондрий проростков гороха; 2 – «старение» митохондрий проростков гороха + 3-ГП; 3 – контроль.

Таблица 1. Сравнительная антирадикальная активность ингибиторов свободнорадикального окисления этилбензола, инициированного термическим распадом азобисизобутиронитрила (k_{INH} , f)

Антиоксидант	$k_{INH} \times 10^{-4} (Mc)^{-1}$	f	Источник
N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина	3,84	0,78	-
Дибунол	2,0–2,2	1,9	Эмануэль, Гал, 1984; Шляпинтох и др., 1966
Хроман CrC ₁	452	2,0	Эмануэль, Гал, 1984; Русина и др., 2013

оксидантов, на живые системы разной степени сложности: от ферментов и мембран до целых организмов (Бурлакова и др., 2007; Пальмина и др., 2012). По мнению ряда авторов, биологические эффекты высококонцентрированных растворов антиоксидантов, вероятно, связаны с образованием их молекулярных ансамблей с молекулами воды (наноассоциатов) и реакцией биообъектов на эти ансамбли (Рыжкина и др., 2009; Коновалов и др., 2017). Препарат снижал интенсивность ПОЛ в мембранах митохондрий, что может свидетельствовать о наличии у него антистрессовых свойств. Поскольку в модельной системе 3-ГП в концентрационном интервале от 10^{-14} до 10^{-5} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха, то в исследованиях его протекторных свойств использовали концентрации 10^{-13} и 10^{-6} М.

Дефицит воды приводил к активации ПОЛ в мембранах митохондрий этилированных проростков гороха, о чем свидетельствует почти 6-кратное увеличение интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (рис. 3). Обработка семян и проростков гороха 10^{-13} и 10^{-6} М раствором 3-ГП приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольного уровня. Результаты изучения влияния дефицита воды на интенсивность ПОЛ в мембранах митохондрий, подвергнутых дефициту воды, согласуются с полученными ранее нами данными по действию недостаточного увлажнения и обработки семян гороха антиоксидантами из класса пространственно затрудненных фенолов на эти процессы (Zhigacheva et al., 2016; Жигачева, 2018).

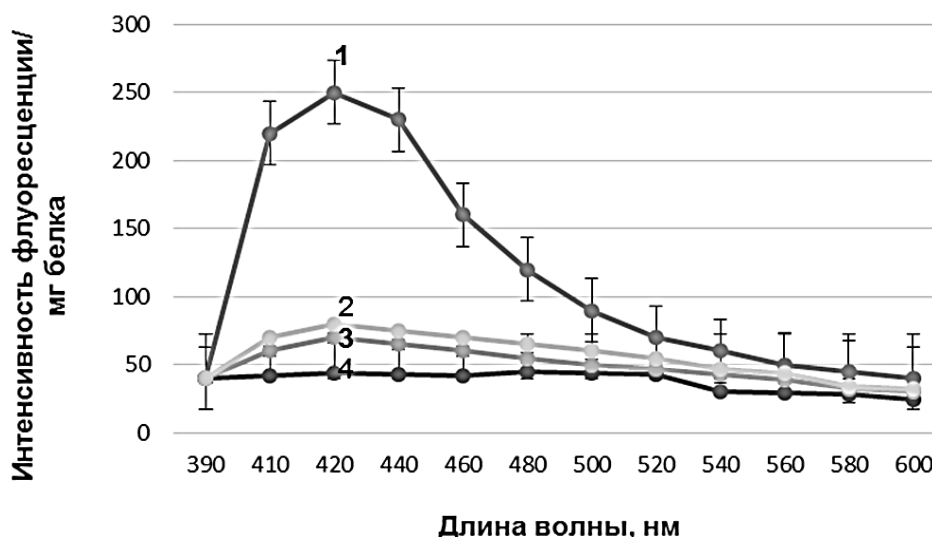


Рис. 3. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридином. 1 – ДВ; 2 – ДВ + 3-ГП (10^{-6} М); 3 – ДВ + 3-ГП (10^{-13} М); 4 – контроль.

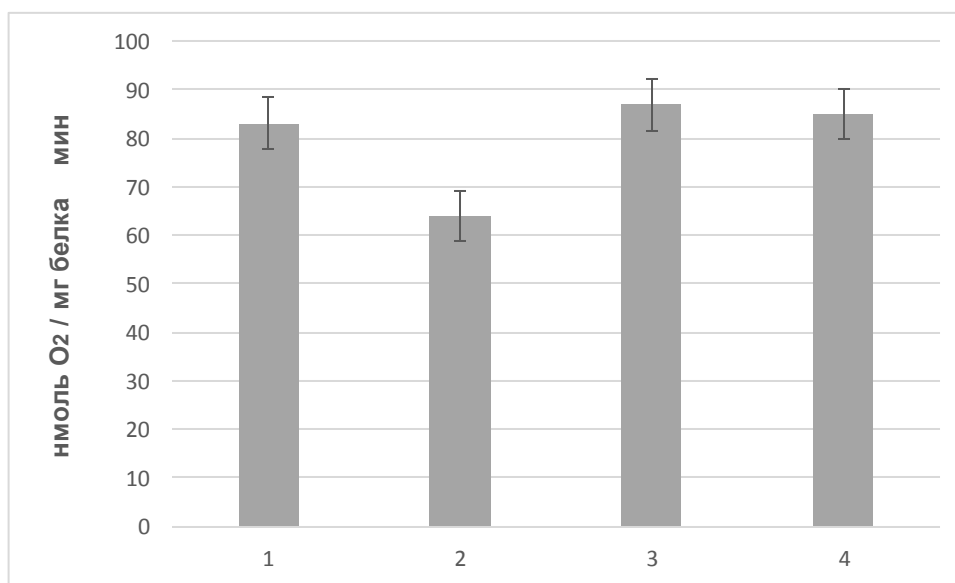


Рис. 4. Скорости окисления сукцината митохондриями проростков гороха при дефиците воды (ДВ) и действии 3-ГП.

Среда инкубации содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ K_2HPO_4 , 4 мМ MgCl_2 , 0,1% БСА. Дополнительные добавки: 5 мМ сукцинат, 0,5 мкМ FCCP. 1 – контроль; 2 – ДВ; 3 – ДВ + 3-ГП (10^{-13} М); 4 – ДВ + 3-ГП (10^{-6} М).

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождалось 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования (табл. 2). При этом скорости окисления сукцината снижались всего на 10-15% (рис. 4), что указывает на большую устойчивость комплекса II дыхательной цепи к окислительному стрессу, в частности к дефициту воды, и согла-

суется с данными, полученными на митохондриях, выделенных из *Arabidopsis* (Sweetlove et al., 2002).

Нарушение функционирования I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий, по-видимому, обусловлено окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, и, следовательно, снижением содержания этого фосфолипида во внутренней

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА

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

Вариант	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	ДК	ФССР
Контроль	25,0±1,0	70,0±3,1	29,8±2,0	2,35±0,01	74,1±3,8
ДВ	15,0±2,1	50,6±2,5	29,9±1,0	1,67±0,02	51,0±2,2
ДВ+3-ГП (10 ⁻⁶ М)	24,1±1,8	73,6±2,8	29,7±1,6	2,48±0,01	74,8±3,2
ДВ+3-ГП (10 ⁻¹³ М)	21,8±2,0	72,0±2,4	27,2±1,3	2,64±0,01	76,5±4,1

Примечание. Среда инкубации: 0,4 М сахараза, 20 мМ НЕРЕС-Tris буфер (рН 7,2), 5 мМ КН₂РО₄, 4 мМ MgCl₂, 0,1% БСА, 10 мМ малаг, 10 мМ глутамат. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10⁻⁶ М ФССР (карбонилцианид-р-трифторметоксифенилгидразон). Условные обозначения: Состояние 2 – скорости окисления субстратов; Состояние 3 – скорости окисления субстратов в присутствии АДФ; Состояние 4 – скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ).

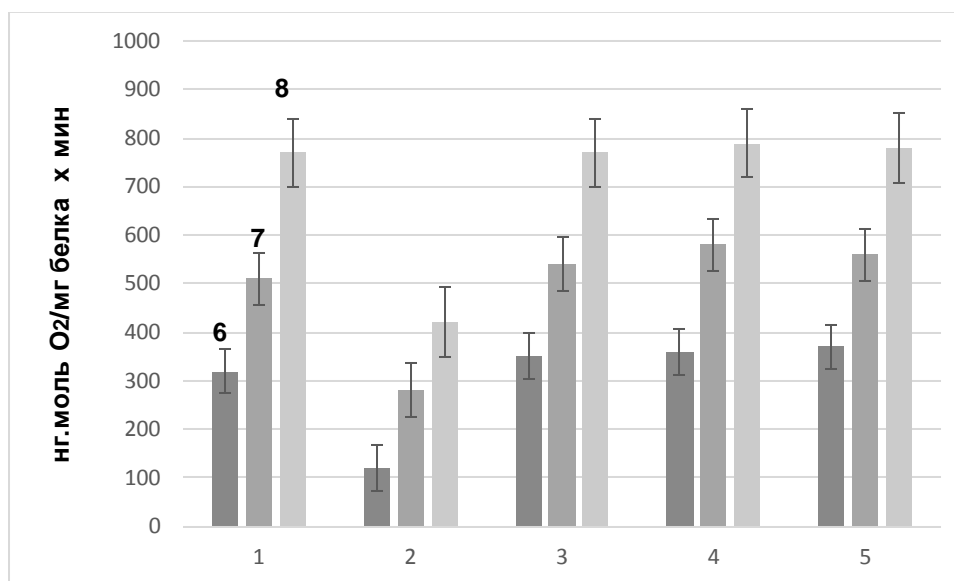


Рис. 5. Скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД митохондриями проростков гороха. 1 – контроль; 2 – ДВ; 3 – ДВ + цитохром с; 4 – ДВ + 3-ГП (10⁻¹³ М); 5 – ДВ + 3-ГП (10⁻⁶ М). Среда инкубации содержала: 0,4 М сахараза, 10 мМ аскорбат, 60 мкМ ротенон, 5мкМ антимицин А, 0,5 мкМ ФССР. 6 – 200 мкМ ТМФД (N,N,N',N'-тетраметил-р-фенилендиамин); 7 – 400 мкМ ТМФД; 8 – 600 мкМ ТМФД. Цитохром с добавляли в среду в концентрации 5×10⁻⁶ М.

мембране митохондрий (Paradies et al., 2004). Подтверждением этому предположению является двукратное снижение скоростей транспорта электронов на конечном цитохромоксидазном участке дыхательной цепи митохондрий проростков гороха, находящихся в условиях дефицита воды (рис. 5).

Введение в среду инкубации этих митохондрий, 5×10⁻⁶ М цитохрома с приводило к восстановлению скоростей окисления пары аскорбат + ТМФД до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома с, вероятно, обусловленной окислением кардиолипина во внутренней мембране этих органелл. В пользу этого 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 большого объема в группе проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало о набухании митохондрий (рис. 6).

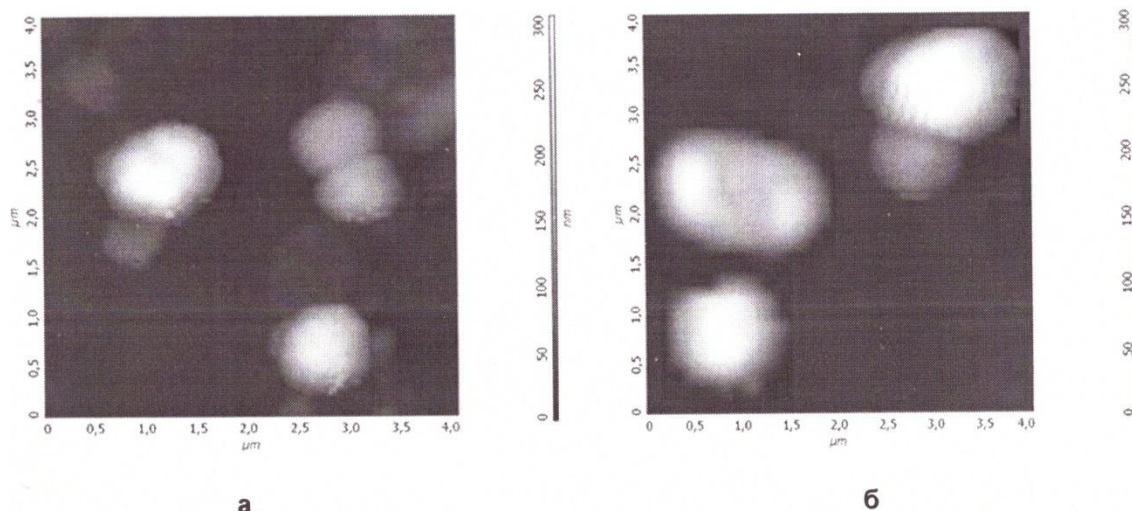


Рис. 6. АСМ изображения митохондрий проростков гороха в контроле (а) и при дефиците воды (б). На рисунке представлены двумерные изображения митохондрий ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$), выделенных из 5-дневных этиолированных проростков гороха.

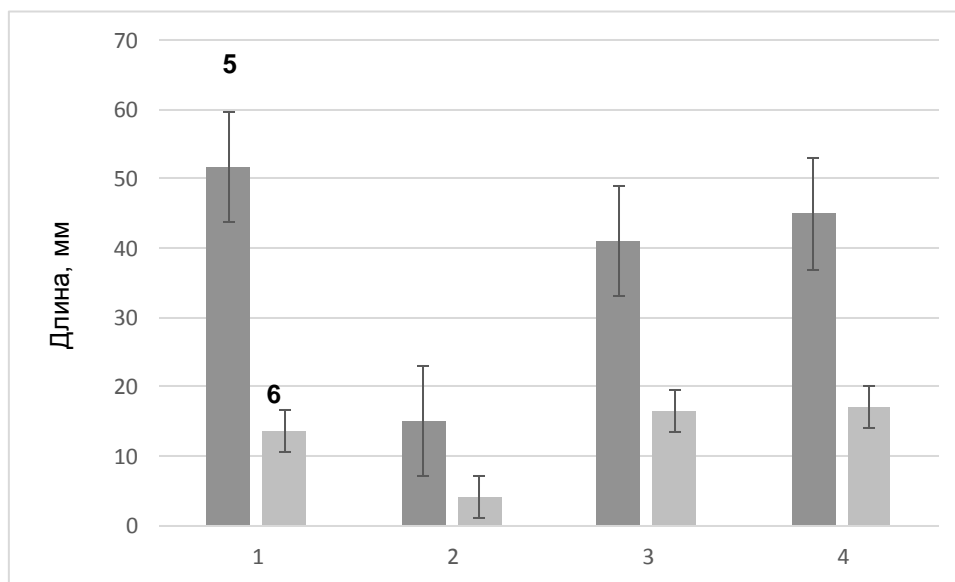


Рис. 7. Влияние дефицита воды (ДВ) и 3-ГП на длину побегов (5) и корней (6) 5-дневных проростков гороха.

1 – контроль; 2 – ДВ; 3 – ДВ + 3-ГП (10^{-13} М); 4 – ДВ + 3-ГП (10^{-6} М).

Обработка семян и проростков гороха 10^{-13} или 10^{-6} М раствором 3-ГП, защищая от пероксидного окисления ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран, вероятно, предотвращала набухание митохондрий и частичную потерю цитохрома *c*. При этом восстанавливались скорости транспорта электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи (рис. 5) и сохранялись высокие скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP (табл. 2).

Влияние препарата на интенсивность ПОЛ в мембранах митохондрий и биоэнергетические характеристики этих органелл, вероятно, определено тем, что он обладает мембранотропными свойствами (Дюмаев и др., 1995; Кузнецов и др., 2006). Механизм действия производных 3-ОП, к которым относится и исследуемый нами препарат, обусловлен взаимодействием их с гидроксильными радикалами и гидропероксидами липидов после проникновения в толщу липидного слоя мембраны (Goba I., Liepinsh E., 2013). Предотвращая пероксидацию фосфолипидов, главным образом кардио-

липина, 3-ГП по-видимому, предупреждает диссоциацию суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий и выход цитохрома *c* (Genova, Lenaz, 2014; Petereit et al., 2017), обеспечивая эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий, что может отразиться на физиологических показателях.

Действительно, 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. Известно, что проростки гороха особенно чувствительны к дефициту воды. При этом на ранних этапах роста проростки более чувствительны к дефициту воды, чем на последующих (Генерозова, Шугаев, 2012). Обработка семян и проростков гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста корней и побегов в этих условиях. При этом длина корней проростков, обработанных как 10^{-6} М, так и 10^{-13} М раствором 3-ГП была на 20% больше, чем у проростков контрольной группы (рис. 7). Препарат предупреждал торможение роста побегов в условиях дефицита воды. Однако, длина побегов проростков гороха, обработанных препаратом, была все же ниже контрольных значений приблизительно на 20%.

Адаптогенные свойства 10^{-6} М 3-ГП, вероятно, могут быть обусловлены его антиоксидантной и антирадикальной активностью. Снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления находит отражение в низкой интенсивности ПОЛ. Кроме того, на животных объектах показано, что производные 3-ОП повышают активность антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы (Микуляк, 2010). Поэтому, адаптогенные свойства исследуемого препарата могут быть также обусловлены активацией ферментов антиоксидантной системы.

Протекторное действие препарата в очень низкой концентрации 10^{-13} М можно объяснить двумя предположениями. Во-первых, возможно накопление препарата в биологических мембранах, в том числе и в митохондриях. Во-вторых, биологические эффекты высококонцентрированных растворов исследуемого соединения могут быть связаны с образованием его молекулярных ансамблей с молекулами воды (нано-ассоциатов) и реакцией митохондрий на эти ансамбли (Рыжкина и др., 2009).

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности исследования действия N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидрокси-

пиридина в качестве регулятора устойчивости растений в концентрационном интервале, в котором препарат предотвращает активацию ПОЛ в модельных экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. 2007. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. В кн.: Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты. Москва–Ижевск : 390-423.
- Генерозова И.П., Шугаев А.Г. 2012. Дыхательный метаболизм митохондрий проростков гороха разного возраста в условиях дефицита воды. Физиология растений. 59: 262-273.
- Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. 1995. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. Москва: 271 с.
- Жигачева И.В. 2018. Пространственно затрудненные фенолы повышают устойчивость проростков гороха к стрессовым воздействиям. В кн.: Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Сборник материалов (в двух частях) Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.). Иркутск, ч. 2 : 1236-1240.
- Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Салахутдинова О.А., Муртазина Л.И., Шевелев М.Д., Воейков В.Л., Буравлева Е.В., Глыбин А.В., Скрипников А.Ю. 2017. Влияние самоорганизации и свойств водных дисперсных систем на основе пептида мха PpCLE2 в интервале низких концентраций на рост корней *Arabidopsis thaliana*. Изв. АН. Сер. химическая. 66 (9) : 1699-1705.
- Кузнецов Ю.В., Матюшин И.А., Смирнов Л.Д., Яценев В.В. 2006. Исследование антиоксидантной активности новых аналогов этилметилгидроксипиридина сукцината и производных гидроксипиридинбензимидазола. Вестн. новых мед. технол. 13 (3) : 9-10.
- Микуляк Н.И. 2010. Фармакологическая коррекция оксидантного и метаболического статуса при цитотоксической болезни, вызванной облучением. Современные проблемы науки и образования. 6 : 14-19.
- Пальмина Н. П., Часовская Т.Е., Белов В.В., Мальцева Е.Л. 2012. Дозовые зависимости изменения микровязкости липидов биологических мембран, индуцированные синтетическим антиоксидантом фенозаном калия. Доклады АН. 443 (4) : 511-515.
- Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. 2003. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. Биохимия. 68 (7) : 910-916.

- Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касаикина О.Т. 2013. Хемилюминисцентные методы в исследовании ингибированного окисления. *Химическая физика*. 32 (8) : 49-64.
- Рыжкина И. С., Муртазина Л. И., Киселева Ю. В., Коновалов А. И. 2009. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ. *Докл. АН*. 428 (4) : 487-491.
- Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Н.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. 2009. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе. *Цитология*. 51 (4) : 329-334.
- Харитонов С.В. 2005. Онкопротекторное действие некоторых антиоксидантов на модели экспериментального канцерогенеза. *Волгоград* : 86 с.
- Чечет О.Ю. 2010. Влияние новых производных 3-гидроксипиридина на процесс свободнорадикального окисления белков. *Саранск*: 156 с.
- Шляпинтох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. 1966. Хемилюминисцентные методы исследования медленных химических процессов. *Москва* : 300 с.
- Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И., Орехова С.О., Шугаев А.Г. (2007). Влияние водного дефицита на дыхание проводящих пучков листового черешка сахарной свеклы. *Физиология растений*. 54 (3): 373-380.
- Эмануэль Н.М., Гал Д. 1984. Окисление этилбензола (модельная реакция). *Москва* : 376 с.
- Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem*. 52 : 1-9.
- Genova M.L., Lenaz G. 2014. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1837 (4) : 427-443.
- Grabelych O.I., Sumina O.N., Funderat S.P., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K., Kolesnichenko A.V. 2004. The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening. *J. Thermal Biol*. 29 : 165-175.
- Goba I., Liepinsh E. 2013. ¹⁵N NMR of 1,4-dihydropyridine derivatives. *Magn. Reson. Chem*. 51 (7) : 391-396.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford : 851 p.
- Munoz-Pinedo C., Guio-Carrion A., Goldstein J.C., Fitzgerald P., Newmeyer D.D., D., Green R. 2006. Different mitochondrial inter membrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (31) : 11573-11581.
- Paradies G., Petrosillo G., Pistolesse M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. 2004. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/perfused rat heart. involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circulation Res*. 94 : 53-59.
- Petereit J., Katayama K., Lorenz Ch., Ewert L., Schert P., Kitsche A., Wada H., Frentzen M., Braun H.P., Eubel H. 2017. Cardiolipin supports respiratory enzymes in plants in different ways. *Front Plant Sci*. 8 : 72. Doi: 10.3389/fpls.2017.00072
- Plotnikov E., Chupyrkina A., Vasileva A., Kazachenko A., Zorov D. 2008. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the pathogenesis of acute renal failure. *Biochim. Biophys. Acta*. 1777 : S58-S59.
- Popov V.N. 2003. Possible role of free oxidation processes in the regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria. *Biochem. Soc. Trans*. 31 : 1316-1317.
- Pryor W.A., Porter N.A. 1990. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Res. Commun*. 8 : 541-543.
- Sweetlove L.J., Heasleywood J.I., Herald V., Hertzapffel R., Day D.A., Leaver C.J., Millar A.N. 2002. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J*. 32: 891-904.
- Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Chermisina Z.V. 1980. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res*. 17 (1) : 173-249.
- Zhigacheva I., Generozova I., Shugaev A., Misharina T., Terenina M. Krikunova N. 2015. Organophosphorus plant growth regulators provides high activity complex I mitochondrial respiratory chain *Pisum sativum* L. seedlings in conditions insufficient moisture. *Ann. Res. Rev. Biol*. 5 (1) : 85-96.
- Zhigacheva I. Biryukov V., Mil' E. 2016. Partial loss of cytochrome C by mitochondria of pea seedlings under conditions of water scarcity. *International J. Scientific Research in Science, Engineering and Technology*. 2 (5) : 369-376.

REFERENCES

- Burlakova E.B., Kondarov A.A., Maltsev E.L. 2007. The effect of ultra-low doses of biologically active substances and low-intensity physical factors. In: *Problemi regulatsii v biologicheskikh sistemakh*. Moscow-Izhevsk : 390-423.
- Generozova I.P., Shugaev A.G. 2012. Respiration metabolism in mitochondria of pea seedlings of different age under water deficit and rewatering. *Russ. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 59 (2) : 235-245. Doi: 10.1134/S1021443712020021
- Dyumayev K.M., Voronina T.A., Smimov L.D. 1995. *Antioksidanty v profilaktike i terapii patologiy*

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА

- TSNS (Antioxidants in the prevention and treatment of pathologies CNS). Moscow : 271 p.
- Zhigacheva I.V. The spatial hindered phenols increase the stability of pea seedling to stress impacts. In: Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental. Book of Proceedings (in two parts) of the All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists (Irkutsk, July 10–15, 2018). Irkutsk, pt. 2 : 1236-1240. Doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-1236-1240
- Konovalov A.I., Ryzhkina I.S., Salakhutdinova O.A., Murtazina L.I., Shevelev M.D., Voeikov V.L., Bulyleva E.V., Glybin A.V., Skripnikov A.Yu. 2017. Effect of selforganization and properties of aqueous disperse systems based on the moss peptide PpCLE2 in a low concentration range on the growth of *Arabidopsis thaliana* roots. Russ. Chem. Bull. 66 (9) : 1699-1705.
- Kuznetsov Yu.V., Matyushin I.A., Smirnov L.D., Yasnetsov V.V. 2006. The way to research antioxidative activity of new analogs of ethylmethylhydroxypyridines succinate and hydroxylpyridobenzimidazole derivants. Vestn. Nov. Med. Tekhnol. 13 (3) : 9-10.
- Mikulyak N.I. 2010. Pharmacological correction of oxidative and metabolic status in cytostatic disease caused by irradiation. *Covremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 6: 14-19.
- Palmina N.P., Chasovskaya T.E., Belov V.V., Maltseva E.L. 2012. Dose dependences of changes in the microviscosity of lipids of biological membranes induced by synthetic antioxidant potassium fenozan. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 443 (1) : 100-104.
- Popov V.N., Ruge E.K., Starkov A.A. 2003 The effect of electronic transport inhibitors on the formation of active forms of oxygen during the oxidation of succinate by pea mitochondria. *Biochemistry (Mosk.)*. 68 (7) : 743-757.
- Rusina I.F., Karpukhin O.N., Kasaykina O.T. 2013. Chemiluminescent methods in the study of inhibited oxidation. *Russ. J. Phys. Chem. B*. 7 (4) : 463-447. Doi: org/10.1134/S1990793113040192
- Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Yu.V., Konovalov A.I. 2009. Properties of supramolecular nanoassociates formed in aqueous solutions of low and ultra-low concentrations of biologically active substances. *Doklady Physical Chemistry*. 428 (2) : 201-205.
- Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Chasovskikh N.Yu., Kaigorodova N.V., Starikova E.G., Starikov Y., Radzivil T.T., Krat I.V. 2009. The role of redox-dependent signaling systems in the regulation of apoptosis in oxidative stress. *Cell Tissue Biol*. 3 (4): 311-316.
- Kharitonov S.V. 2005. Onkoprotektornoye deystviye nekotorykh antioksidantov na modeli eksperimental'nogo kantserogeneza (Oncoprotective effect of certain antioxidants on the model of experimental carcinogenesis). Volgograd : 86 p.
- Chechet O.Yu. 2010. The effect of new 3-hydroxypyridine derivatives on the process of free radical oxidation of proteins. Saransk : 156 p.
- Shlyapintok V.Ya., Karpukhin O.N., Postnikov L.M., Zakharov I.V., Vichutinsky A.A., Tsepalov V.F. 1966. Chemiluminescent metody issledovaniya medlennih himicheskikh processov (Chemiluminescent methods for the study of slow chemical processes). Moscow : 300 p.
- Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Orekhova S.O., Shugaev A.G. 2007. Effect of water deficiency on the respiration of conducting bundles of sugar beet chard. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 54 (3): 329-335.
- Emanuel N.M., Gal D. 1984. Okislenie ethylbenzola (model'naya reakciya) (Ethylbenzene oxidation (model reaction)). Moscow : 376 p.
- Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem*. 52 : 1-9.
- Genova M.L., Lenaz G. 2014. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochem. Biophys. Acta*. 1837 (4) : 427-443.
- Grabelnykh O.I., Sumina O.N., Funderat S.P., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K., Kolesnichenko A.V. 2004. The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening. *J. Thermal Biol*. 29 : 165-175.
- Goba I., Liepinsh E. 2013. ¹⁵N NMR of 1,4-dihydropyridine derivatives. *Magn. Reson. Chem*. 51 (7) : 391-396.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford : 851 p.
- Munoz-Pinedo C., Guio-Carrion A., Goldstein J.C., Fitzgerald P., Newmeyer D.D., D., Green R. 2006. Different mitochondrial inter membrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (31) : 11573-11581.
- Paradies G., Petrosillo G., Pistolesse M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. 2004. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/perfused rat heart. involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circulation Res*. 94 : 53-59.
- Petereit J., Katayama K., Lorenz Ch., Ewert L., Schert P., Kitsche A., Wada H., Frentzen M., Braun H.P., Eubel H. 2017. Cardiolipin supports respiratory enzymes in plants in different ways. *Front Plant Sci*. 8 : 72. Doi: 10.3389/fpls.2017.00072
- Plotnikov E., Chupyrkina A., Vasileva A., Kazachenko A., Zorov D. 2008. The role of reactive oxy-

- gen and nitrogen species in the pathogenesis of acute renal failure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777 : S58-S59.
- Popov V.N. 2003. Possible role of free oxidation processes in the regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 31 : 1316-1317.
- Pryor W.A., Porter N.A. 1990. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Res. Commun.* 8 : 541-543.
- Sweetlove L.J., Heasleywood J.I., Herald V., Hertzappel R., Day D.A., Leaver C.J., Millar A.N. 2002. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J.* 32: 891-904.
- Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Chermisina Z.V. 1980. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.* 17 (1) : 173-249.
- Zhigacheva I., Generozova I., Shugaev A., Misharina T., Terenina M., Krikunova N. 2015. Organophosphorus plant growth regulators provides high activity complex I mitochondrial respiratory chain *Pisum sativum* L. seedlings in conditions insufficient moisture. *Ann. Res. Rev. Biol.* 5 (1) : 85-96.
- Zhigacheva I., Biryukov V., Mil' E. 2016. Partial loss of cytochrome C by mitochondria of pea seedlings under conditions of water scarcity. *International J. Scientific Research in Science, Engineering and Technology.* 2 (5) : 369-376.

Поступила в редакцию
25.09.2018 г.

INFLUENCE OF N-ACETYL-CYSTEINATE 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE ON FUNCTIONING OF MITOCHONDRIA AND RESISTANCE OF PEA PLANTLETS TO WATER DEFICIT

I. V. Zhigacheva¹, V. I. Binyukov¹, E. M. Mil' ¹, I. F. Rusina²

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics
of Russian Academy of Sciences
(Moscow, Russia)*

E-mail: zhigacheva@mail.ru

²*Semenov Institute of Chemical Physics
of Russian Academy of Sciences
(Moscow, Russia)*

In the present work, the possibility of using derivatives of 3-hydroxypyridine, in particular N-acetylcysteinate 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (3-HP), as a regulator of plant growth and development (PGR). The work was carried out on mitochondria of pea seedlings (*Pisum sativum* L.), cv. Alpha. The protective properties of the drug were studied using the model of «aging» of mitochondria. Incubation of mitochondria in hypotonic medium had activated the lipid peroxidation (LPO): fluorescence intensity of the products increased by 6 times compared to the control. 3-HP in concentrations from 10^{-14} to 10^{-6} M reduced the fluorescence intensity of LPO products almost for control values, which probably indicated the presence of anti-stress properties of the drug, the presence of which was studied using a water deficiency model. Water deficiency, triggering lipid peroxidation, leads to decreases the maximum oxidation rates of NAD-dependent substrates and succinate, also the electron transport rates at the terminal stage (the cytochrome oxidase stage) of the mitochondrial respiratory chain. In addition, water deficiency causes mitochondrial swelling. The introduction of 5×10^{-6} M cytochrome *c* into the incubation medium of mitochondria or the treatment of pea seeds and seedlings with 10^{-13} or 10^{-6} M 3-HP restored the electron transfer rates at this site of the respiratory chain. 3-HP, preventing lipid peroxidation, contributed to the preservation of the functional state of the mitochondria, which had an effect on the physiological parameters: the drug prevented a decrease in the growth rate of pea seedlings in water scarcity. On the basis of the obtained data, it is assumed that 3-HP can be used as PGR in concentrations exhibiting an antioxidant effect.

Key words: *Pisum sativum*, 3-hydroxypyridine derivatives, mitochondria, reactive oxygen species, lipid peroxidation, water deficiency

**ВПЛИВ N-АЦЕТИЛЦИСТЕЇНАТ
2-ЕТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГІДРОКСИПІРИДИНУ
НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ І СТІЙКІСТЬ
ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ ДО ДЕФІЦИТУ ВОДИ**

I. В. Жигачова¹, В. І. Бінюков¹, Є. М. Міль¹, І. Ф. Русіна²

¹Федеральна державна бюджетна установа науки
«Інститут біохімічної фізики ім. Н.М. Емануеля РАН»
(Москва, Росія)

E-mail: zhigacheva@mail.ru

²Федеральна державна бюджетна установа науки
«Інститут хімічної фізики ім. М.М. Семенова РАН»
(Москва, Росія)

Досліджували можливість використання похідного 3-гідроксипіридину N-ацетилцистеїнат-2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину (З-ГП) як стрес-протектора рослин. Роботу проводили, використовуючи модель «старіння» мітохондрій проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Інкубація мітохондрій в гіпотонічному середовищі активувала пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ): інтенсивність флуоресценції продуктів збільшувалася в 6 разів порівняно з контролем. З-ГП в концентраціях від 10^{-14} до 10^{-5} М знижував інтенсивність флуоресценції продуктів ПОЛ майже до рівня контрольних значень. Дефіцит води, що спричиняє ПОЛ, знижував максимальні швидкості окиснення НАД-залежних субстратів і сукцинату, а також швидкості транспорту електронів на кінцевій (цітохромоксидазній) ділянці дихального ланцюга. Крім того, водний дефіцит викликав набухання мітохондрій. Введення в середовище інкубації мітохондрій цитохрому *c* в концентрації 5×10^{-6} М або обробка насіння і проростків гороху З-ГП 10^{-13} або 10^{-6} М відновлювали швидкості перенесення електронів на цій ділянці дихального ланцюга. З-ГП, пригнічуючи ПОЛ, сприяв збереженню функціонального стану мітохондрій, що відбивалося на фізіологічних показниках: препарат зменшував ефект пригнічення росту проростків гороху в умовах дефіциту води.

Ключові слова: *Pisum sativum*, похідні 3-гідроксипіридину, мітохондрії, активні форми кисню, пероксидне окиснення ліпідів, дефіцит води