

щих белки, такие как гидрофобин, осморегуляторные белки, ферменты антиоксидантной защиты и биосинтеза фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Таким образом, в ответ на обезвоживание в лишайнике *X. parietina* активируется широкий спектр генов, вовлеченных в защитные механизмы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-14-00327 и в рамках выполнения госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Blin, K. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities [Text] / K. Blin, S. Shaw, A. M. Kloosterman, Z. Charlop-Powers, V. G. P. Wezel, M. H. Medema, T. Weber // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – V.49. – P. 29-35.

2. Llewellyn, T. Metagenomics shines light on the evolution of “sunscreen” pigment metabolism in the *Teloschistales* (lichen-forming Ascomycota) [Text] / T. Llewellyn, R.W. Nowell, A. Aptroot, M. Temina, T.A. Prescott, T.G. Barraclough, E. Gaya // *Genome Biology and Evolution*. – 2023. – V. 15. – P. evad002.

Антиоксиданты повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям

**Жигачева И.В.^{А*}, Крикунова Н.И.^А, Миль Е.М.^А, Генерозова И.П.^Б,
Буцанец П.А.^Б**

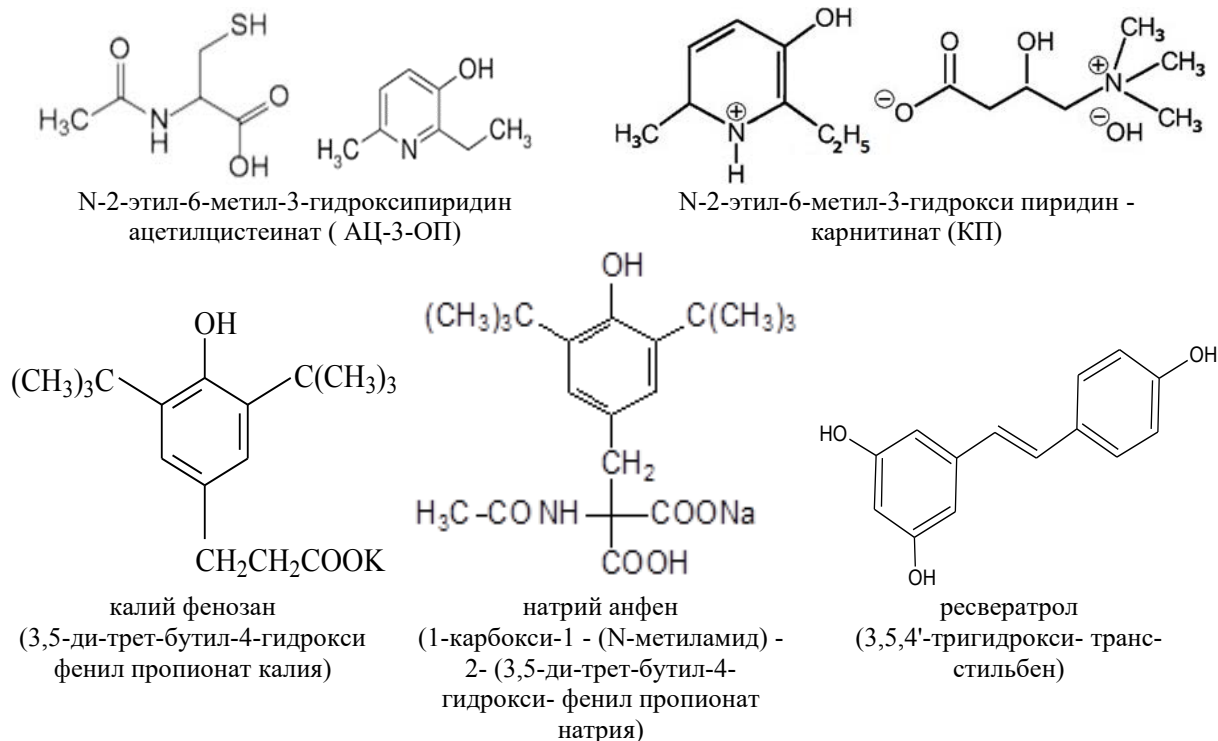
^А Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4, Факс: +7 (499) 137- 41-07. *E-mail: zhigacheva@mail.ru

^Б Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК) в клетках. В физиологических условиях приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате его неполного восстановления образует АФК, которые выполняют функцию сигнальных молекул, регулирующих рост и развитие растений [1]. В норме стационарный уровень АФК в органах и тканях довольно низок (около 10^{-10} М) за счет наличия в них ферментативной и неферментативной систем, контролирующих продукцию и утилизацию этих интермедиатов. Избыток свободных радикалов связан со стрессовыми воздействиями, вызывающими смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации АФК, которые в зависимости от силы стрессового воздействия могут служить индукторами процессов адаптации, либо вы-

зывать нарушение метаболизма клетки [2]. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран митохондрий, приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Под действием АФК в АТФ/АДР-антипортере происходит окисление SH-группы Cys-56, что приводит к открытию поры неспецифической проницаемости митохондрий ("permeability transition pore" (РТР) [3]. При этом нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством этих органелл. В результате происходит набухание митохондрий, выход цитохрома С и, возможно, индукция апоптоза.

В связи с этим мы предположили, что антиоксиданты, снижая содержание АФК в клетке, а, следовательно, и интенсивность ПОЛ, могут играть роль адаптогенов, повышая устойчивость растений к действию стрессовых факторов. Объектом исследования были выбраны антиоксиданты производные 3-оксипиридинов: N- 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин ацетилцистеинат (АЦ-3-ОП), N-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин карнитинат (КП); антиоксиданты из класса пространственно затрудненных фенолов: калий фенозан (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропионат калия) (ФЕН), натрий анфен (1-карбокси-1 - (N-метиламид) - 2- (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропионат натрия) (АНФ) и природный антиоксидант –ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-транс-стильбен) (РВ).



Целью исследования - изучение эффектов исследуемых антиоксидантов на функциональное состояние митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды.

Исследования проводили, используя митохондрии этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора-2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 1 часа замачивали в воде, а опытную группу – в растворе исследуемых антиоксидантов (АО) (соответствующей концентрации). Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. Спустя сутки половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные АО, на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Затем семена группы ДВ переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытной группы - на фильтровальную бумагу, увлажненную исследуемыми АО, где семена обеих групп находились в течение последующих 2 суток. Семена контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 g в течение 5 мин и при 3000 g в течение 3 мин) [4]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Скорости дыхания митохондрий проростков гороха регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris -буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , и 0,1% БСА. Перекисное окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [5]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

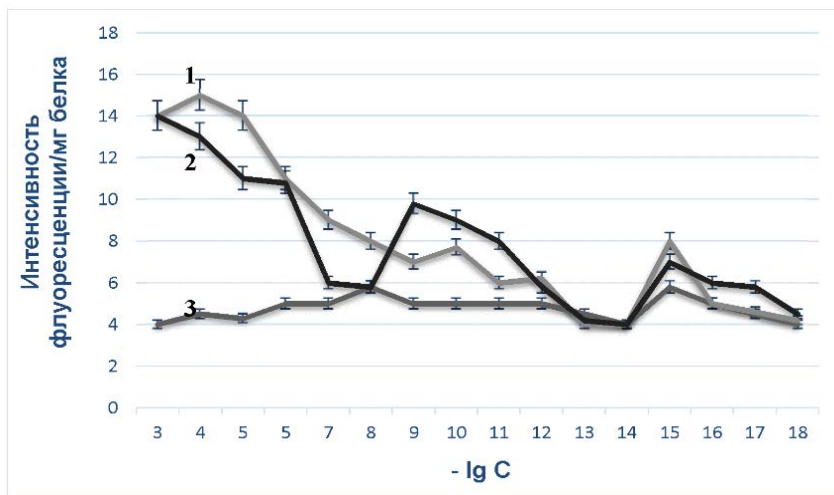
Для активации ПОЛ выделенные митохондрии (2-3 мг белка) помещали в 0,5 мл среды, содержащей 85мМ KCl , 10 мМ HEPES и 1мМ KH_2PO_4 , pH 7,4. Митохондрии инкубировали 20-25 мин при комнатной температуре. В эксперименте использовали реактивы фирм: сахароза,

Трис, ЭДТА, FCCP, АДФ, малат, глутамат (“Sigma Aldrich,” США); БСА, (свободный от ЖК) (“Sigma Aldrich,” США); НЕРЕС (“MP Biomedicals”, Германия), метанол, хлороформ (Merck, Германия).

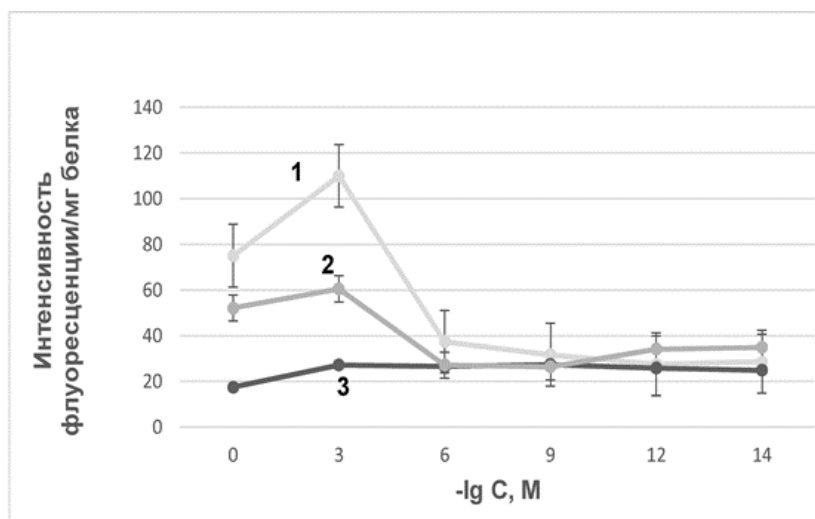
Инкубация митохондрий в гипотоническом солевом растворе вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 3-4 раза (рис. 1). Введение исследуемых антиоксидантов в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозовую зависимость. Калий фенотан в концентрациях 10^{-7} - 10^{-8} М и 10^{-12} - 10^{-14} М снижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха почти до контрольных значений. Натрий анфен эффективно понижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в концентрациях 10^{-11} - 10^{-14} М. Эффективными концентрациями для АЦ-3-ОП и КП были 10^{-6} - 10^{-14} М. И, наконец, РВ предотвращал активацию ПОЛ в концентрационном интервале 10^{-5} - 10^{-14} М. Предупреждение активации ПОЛ исследуемыми АО, вероятно, указывало на наличие у них антистрессовых свойств.

Наличие этих свойств у исследуемых АО мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали АО в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ. Наличие этих свойств у исследуемых АО мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали ФЕН в концентрации 10^{-8} М и АНФ в концентрации 10^{-13} М, АЦ-3-ОП и КП - в концентрации 10^{-9} М, РВ - в концентрации 10^{-5} М. Дефицит воды приводил к активации свободно радикального окисления в мембранах митохондрий проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Отметим, что обработка семян гороха АО вызывала снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ (рис. 2).

a



б



в

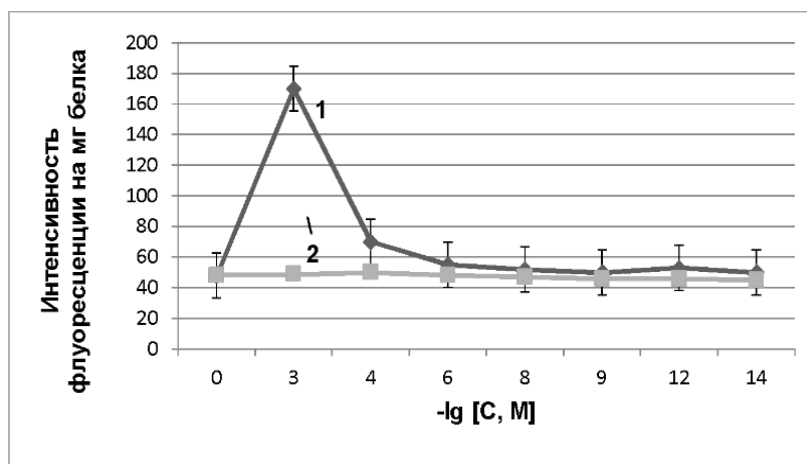
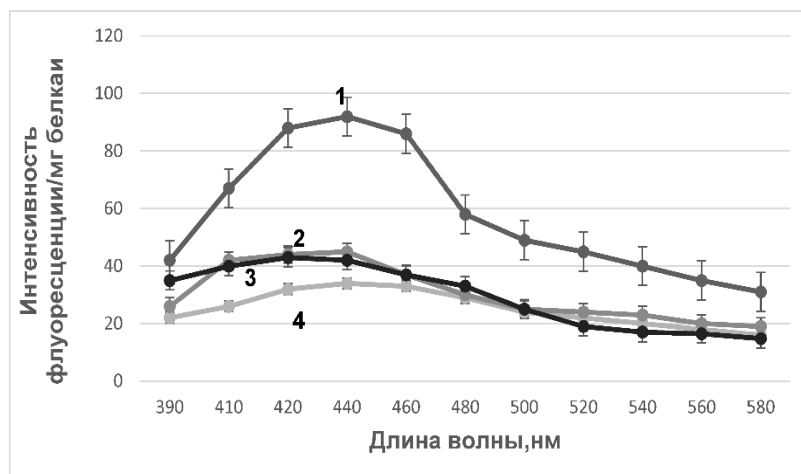
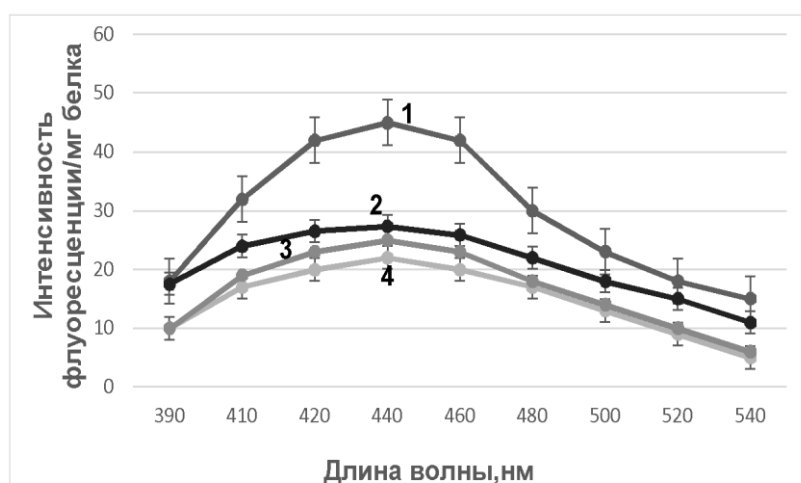


Рис 1. Влияние различных концентраций антиоксидантов (АО) и «старения» митохондрий на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ:
a – 1- «старение» митохондрий + натрия анфен (АНФ); 2- «старение» митохондрий + калия фенозан (ФЕН) 3- контроль; *б* – 1- «старение» митохондрий + АЦ-3-ОП; 2-«старение» митохондрий +КП; 3-контроль; *в* – 1- РВ; 2-контроль.

a



б



в

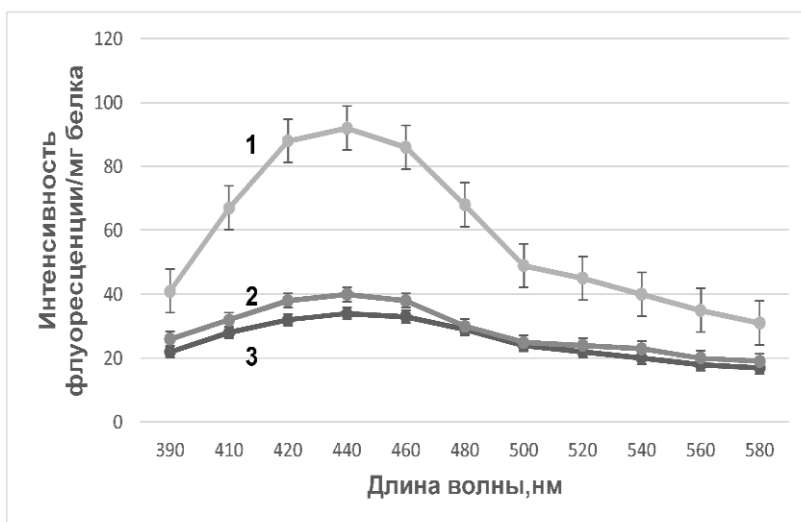


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этилированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян АО:

a – 1- ДВ; 2 - ДВ+АНФ; 3 - ДВ+ФЕН; 4 – контроль; *б* – 1-ДВ; 2 – ДВ+АЦ; 3 - ДВ + КП; 4 – контроль; *в* – 1 - ДВ; 2 - ДВ+РВ; 3 –контроль

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий в условия дефицита воды сопровождались 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Обработка семян и проростков гороха АО в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ, способствовала сохранению эффективности окислительного фосфорилирования и поддержанию высоких скоростей окисления НАД-зависимых субстратов.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразилось и на физиологических показателях, а именно, на росте проростков. Дефицит воды резко снижал ростовые процессы. Обработка семян и проростков гороха используемыми концентрациями антиоксидантов предотвращала угнетение роста корней и побегов.

Адаптогенные свойства исследуемых антиоксидантов, вероятно, могут быть обусловлены их антиоксидантной активностью. Предотвращая пероксидацию фосфолипидов, исследуемые антиоксиданты, по-видимому, обеспечивали эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий. Это, вероятно, определяло устойчивость проростков к действию стрессовых факторов.

Библиографические ссылки

1. Schieber M., Chandel N. S. *Current Biology*. 2014, 24 (10), R453-R462 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
2. Javadov S., Karmazyn M. *Cell Physiol Biochem*. 2007, 20(1-4), 1-22 doi :10.1159/000103747.
3. Новодережкина Е.А., Животовский Б. Д., Гогвадзе В. Г. Молекулярная биология. 2016, 50 (1), 51–68 doi: 10.7868/S002689841601016X.
4. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. *Anal. Biochem*. 1973, 52, 1–9 doi: 10.1016/0003-2697(73)90327-8.

Влияние прайминга семян на скорость окислительных процессов и активность пероксидазы в проростках пшеницы в условиях засоления

Жук Е. А.^А, Филиппова Г. Г.^{А*}

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: filiptsova@bsu.by*

Прайминг семян представляет собой метод контролируемых циклов гидратации и обезвоживания семян перед посевом, при котором активи-