

6. Berker K. I. et al. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents // *Talanta*. – 2007. – №72 (3). – P. 1157–1165.
7. Valgas C et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2007. – №38 (2). – P. 369–380.
8. Ermoshin A. A et al. Phenolic Compounds and Biological Activity of Extracts of Calli and Native Licorice Plants // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2024. – Vol. 71:20. – 9 P.
9. Ghorbanpour M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide // *Indian Journal of Plant Physiology*. – 2015. – №20 (3). – P. 249–256.

Воздействие свободных аминокислот на генерацию активных форм кислорода в условиях *in vitro* и *in vivo*

**Мацкевич В. С.^{A*}, Арзамазкина К. И.^A, Герман А. Д.^A,
Муравицкая А. О.^A, Чирская А. И.^A, Козел А. В.^A**

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

Гидроксильный радикал (НО[•]) является наиболее реакционноспособной АФК и представляет наибольшую опасность для живых систем [1]. За счет высокого редокс-потенциала ($E_0 = +2,32$ В, рН 7) гидроксильный радикал может окислять практически любое химическое соединение, включая ДНК, белки и липиды [2], опосредуя большинство цитотоксических эффектов в аэробных организмах. Один из путей образования НО[•] в живых системах – это восстановление H₂O₂, катализируемое ионами переходных металлов (Fe²⁺, Cu⁺ и др.). В связи с этим, данная реакция часто используется для количественной оценки антиоксидантной способности растительных экстрактов и биологически активных веществ. Известно, что пул свободных аминокислот играет важную роль в росте и развитии растений, сигнальных явлениях, а также участвует в реакции растения на стресс [3]. Целью данной работы было оценить способность важнейших аминокислот влиять на продукцию НО[•] в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Анализ продукции гидроксильных радикалов осуществлялся методом спектрометрии электронного парамагнитного резонанса. В качестве спиновой ловушки добавляли ДМПО (5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид) в концентрации 100 ммоль/л. Сигнал ДМПО-НО[•] регистрировался при помощи ЭПР-спектрометра SpinscanX и анализировался в программе eSpinoza (ADANI). Эксперименты *in vivo* проводились с использованием модельных растений *Arabidopsis thaliana* природного

экотипа Col-0. Растения выращивались в стерильной вертикальной культуре в чашках Петри на полной среде Мурасиге и Скуга, pH 6,0, 1% сахара, 0,35% Phytigel в контролируемых условиях (22°C, 16 ч свет/ 8 ч темнота). Уровень АФК в клетках корня 7-дневных проростков арабидопсиса после 30 мин воздействия стресс растворов регистрировался при помощи флуоресцентного зонда дигидроэтидиум (ДГЭ; $\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 540$ нм) на флуоресцентном микроскопе Nikon TS100. Изображения анализировались при помощи приложения ImageJ.

Результаты и их обсуждение. С использованием ЭПР-спектрометрии было показано, что смесь 1 ммоль/л $CuCl_2$, 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2 , pH 6 (Cu/a) с добавлением 100 ммоль/л ДМПО генерирует характерный четырехпиковый сигнал аддуктов ДМПО-НО[•]. Интенсивность данного ЭПР-сигнала была в 70 раз выше по сравнению с контролем (буферный раствор: 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л $CaCl_2$, 1 ммоль/л ТРИС, 2 ммоль/л МЕС). Было продемонстрировано, что интенсивность ЭПР-сигнала ДМПО-НО[•] значительно снижалась в присутствии свободных аминокислот (1 ммоль/л гистидина, аланина, аспарагина и пролина). Сами аминокислоты не модифицировали сигнал ДМПО, т.е. не обладали редокс-активностью. В случае добавления гистидина Cu/a ЭПР-сигнал уменьшался приблизительно на 80%, аланина – на 95%, аспарагина – на 90%. Добавление пролина не воздействовало на ЭПР-сигнал, вызываемый аддуктами ДМПО-НО[•]. Результаты также были подтверждены с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и зонда дигидроэтидиум в интактных корнях *Arabidopsis thaliana*, однако в данном случае эффекты были ниже. Таким образом, в работе было продемонстрировано, что свободные аминокислоты могут снижать ферментативную продукцию НО[•] в водных растворах и оказывать умеренное протекторное влияние на генерацию активных форм кислорода в интактных корнях растений при окислительном стрессе.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060) и ГПНИ (№ ГР 20241163).

Библиографические ссылки

1. Halliwell H., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015. – 905 p.
2. Sanna D, Fadda A. Role of the hydroxyl radical-generating system in the estimation of the antioxidant activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR) // Molecules. 2022. Vol. 27(14). 4560.
3. Trovato M., Funck D., Forlani G. et al. Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense // Front Plant Sci. 2021. Vol. 12. 772810.