

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ВОЗДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

К. И. Арзамазкина¹⁾, А. Д. Герман²⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, arzamazkina@yandex.by

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь

Научный руководитель – В. С. Мацкевич

Активные формы кислорода (АФК) являются продуктами нормального метаболизма в клетках живых организмов, однако их повышенная продукция в ответ на действия абиотических и биотических факторов среды приводит к развитию оксидативного стресса, который в свою очередь приводит к повреждению биомолекул и даже гибели. В данной работе была изучена способность различных аминокислот влиять на выработку АФК в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: активные формы кислорода; гидроксильный радикал; ЭПР-спектроскопия; арабидопсис.

Одним из наиболее значимых повреждающих факторов среды, действующих на биологические макромолекулы, являются активные формы кислорода (АФК). Среди них гидроксильный радикал (НО•) обладает наивысшей реакционной способностью и является наиболее опасным 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 H_2O_2 , катализируемое ионами переходных металлов (Fe^{2+} , 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*.

Для исследования химии свободных радикалов использовался метод ЭПР-спектроскопии. В качестве контроля выступал буфер: 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl₂, 1 ммоль/л ТРИС, 2 ммоль/л МЕС, pH 6. В качестве системы генерации гидроксильного радикала была использована смесь: 1 ммоль/л CuCl₂, 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H₂O₂ (Cu/a). В данные растворы вводился 1 ммоль/л аминокислоты (пролина, гистидина, аланина или аспарагина). В качестве спиновой ловушки добавляли ДМПО (5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид) в концентрации 100 ммоль/л. Эксперимент проводился с помощью ЭПР-спектрометра SpinscanX, ADANI. Было показано, что смесь Cu/a с добавлением ДМПО генерирует характерный четырехпиковый сигнал аддуктов ДМПО-НО• (рис. 1). Интенсивность данного ЭПР-сигнала была в 125 раз выше по сравнению с контролем (буферный раствор).

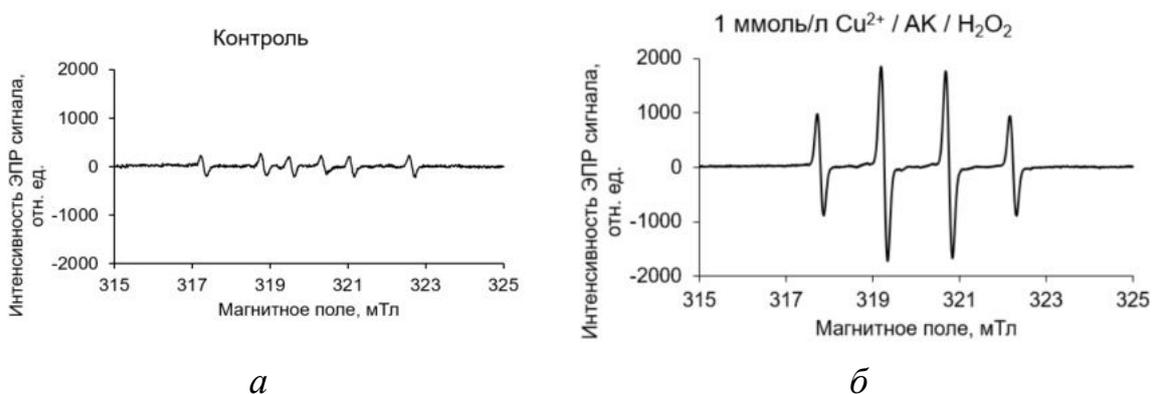


Рис. 1. Типичные ЭПР-кривые сигнала ДМПО-НО•, полученные в тест-растворах: а – контроль (буферный раствор, состоящий из 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl₂, 1 ммоль/л ТРИС, 2 ммоль/л МЕС, pH 6); б – смесь, генерирующая гидроксильные радикалы (Cu/a; 1 ммоль/л CuCl₂, 1 ммоль/л аскорбат, 1 ммоль/л H₂O₂)

При добавлении к Cu/a растворов протеиногенных аминокислот в концентрации 1 ммоль/л интенсивность ЭПР-сигнала ДМПО-НО• значительно снижалась: в случае добавления гистидина на 80%, аланина – на 95%, аспарагина – на 90%. Добавление пролина не оказывало достоверных эффектов. Следует отметить, что сами аминокислоты не модифицировали сигнал ДМПО, т.е. не обладали редокс-активностью.

Аналогичные результаты были получены с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и зонда дигидроэтидиум (ДГЭ) в интактных корнях *Arabidopsis thaliana* природного экотипа Col-0, однако в данном случае эффекты были ниже (рис. 2). Было показано, что при добавлении смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, интенсивность флуоресценции ДГЭ увеличивалась на 15% в кончиках корней и на 17% в зрелой части ризодермиса по сравнению с контролем.

При совместном введении аминокислот и смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, можно увидеть, что пролин снизил интенсивность флуоресценции на 8% и 3% в кончиках корней и зрелой зоне соответственно. Добавление гистидина не повлияло на интенсивность флуоресценции в кончиках корней, а в зрелой зоне снизило ее на 9%. Аланин снизил интенсивность флуоресценции на 6% в кончиках корней и на 7% в зрелой зоне.

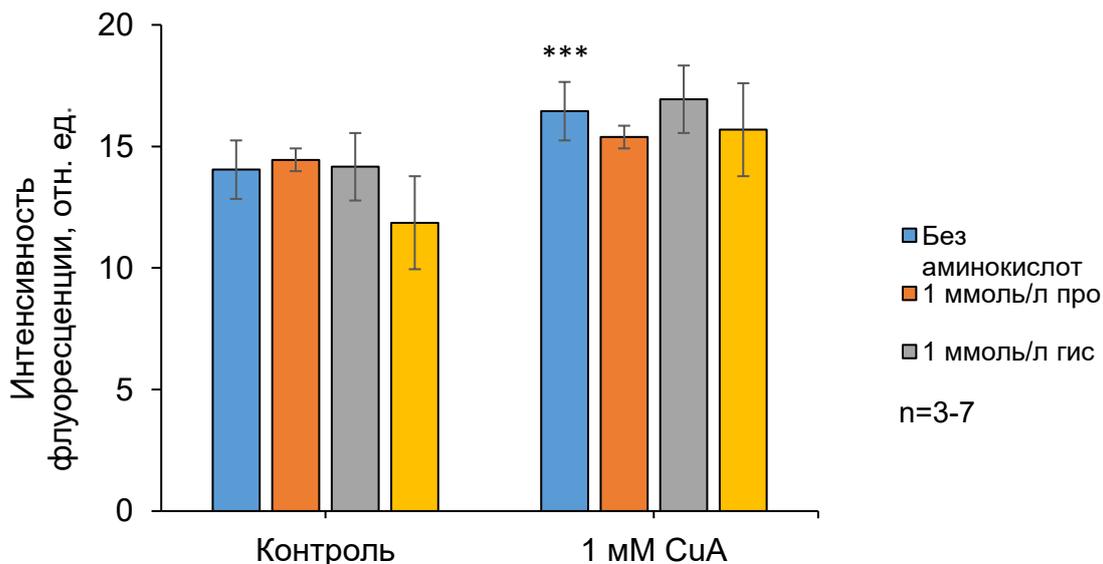


Рис. 2. Среднее значение флуоресценции ДГЭ ($\pm Sx$) в кончиках корней *Arabidopsis thaliana* (тест на накопление АФК).

Примечание. Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю (без добавления Cu/a и аминокислот) при помощи теста ANOVA: *** – $p < 0,001$

Таким образом, в работе было продемонстрировано, что свободные аминокислоты могут снижать ферментативную продукцию HO^\bullet в водных растворах и оказывать умеренное протекторное влияние на генерацию активных форм кислорода в интактных корнях растений при окислительном стрессе. Протекторное действие аминокислот, вероятно, происходит за счет хелатирования меди, а также возможно за счет других механизмов. Полученные сведения могут быть использовано в сельском хозяйстве и при селекции устойчивых сортов.

Работа была выполнена в рамках задания ГПНИ «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий» подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии 2»

государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 годы.

Библиографические ссылки

1. *Halliwell H., Gutteridge J. M. C.* Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015.

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, iss.14. P.45-60.

3. *Trovato M., Funck D., Forlani G.* Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense // *Front Plant Sci*. 2021. Vol. 12. P.772-810.