

ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА С ТИОСУЛЬФАТНЫМИ ЛИГАНДАМИ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Жигачева И.В.¹, Крикунова Н.И.¹, Генерозова И.П.², Буцанец П.А.², Васильева С.В.¹,
Расулов М.М.³

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, г. Москва, 127276, РФ; e-mail: igenozova@mail.ru

³ Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений
и. Энтузиастов, 38, г. Москва, 105118, РФ; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com
Поступила в редакцию 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0477

Аннотация. Исследовано влияние стрессовых воздействий (дефицита воды, высокотемпературного стресса) и донора оксида азота натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрата $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ-тио) на жирнокислотный состав и биоэнергетические характеристики митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха. Стрессовые воздействия вызывали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий. При этом значительные изменения происходили в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК). Снижение содержания линолевой и линоленовой кислот – одних из основных ЖК, входящих у высших растений в состав кардиолипина, по-видимому, вызывало снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. Обработка семян гороха 10^{-6} М ТНКЖ-тио предотвращала активацию ПОЛ, изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий и способствовала сохранению биоэнергетических характеристик этих органелл. Предупреждая снижение энергетического метаболизма ТНКЖ-тио, вероятно, обладает адаптогенными свойствами, которые отразились и на физиологических показателях, а именно на росте проростков. Обработка семян и проростков гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста корней и побегов в условиях дефицита воды. На основании полученных данных можно прийти к заключению, что протекторные свойства ТНКЖ-тио обусловлены его антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: доноры оксида азота, дефицит воды, тепловой стресс, митохондрии, жирные кислоты

Растения, ведущие прикрепленный образ жизни, подвергаются различным биотическим и абиотическим стрессовым воздействиям. Стрессовые факторы, такие как дефицит воды, патогены, высокие и низкие температуры, тяжелые металлы, вызывают в клетках растений изменение метаболизма липидов, результатом которого является адаптивная модификация липидных компонентов мембран и, в том числе, мембран митохондрий [1,2].

Эти органеллы занимают ключевые позиции в энергетических, окислительно-восстановительных и обменных процессах в клетке. Они играют одну из основных ролей в ответе растений на действие стрессовых факторов. При этом изменяется количество и степень насыщенности жирных кислот, входящих в состав липидного бислоя, возможно, это является сигналом действия стрессового фактора [3,4].

Изменения липидного компонента мембран, по-видимому, влияет на белок-липидные взаимодействия, что сказывается на активности белков-ферментов, входящих в состав дыхательной цепи митохондрий. Вероятно, это в некоторой степени обеспечивает защиту этих органелл и клетки от окислительного стресса. Действительно, при действии низких положительных температур на проростки озимой пшеницы функциональная активность митохондрий определяется составом жирных кислот их мембран. Среди этих кислот важную роль играет α -линоленовая кислота [5]. В условиях солевого и осмотического стресса в митохондриях этиолированных проростков твердой пшеницы, ячменя, томата, полбы, также зеленых проростков кукурузы наблюдается увеличение содержания свободных жирных кислот, обладающих разобщающим эффектом и активирующих АТФ-чувствительный калиевый (mitoK_{ATP}) канал, что приводит к снижению избыточной генерации АФК [6].

Однако, при длительном действии стрессового фактора или при сильном стрессовом воздействии защитные механизмы не справляются с чрезмерной генерацией АФК. В результате взаимодействия АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав мембран митохондрий, происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию токсических для клеток растений продуктов: альдегидов и 4-гидрокси-2,3-ноненалов. Эти токсиканты ингибируют ферменты, вовлеченные в основные метаболические пути: одни из них, ингибируя глицин-декарбоксилазу, угнетают фотодыхание, другие, производя ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы – фермента цикла трикарбоновых кислот, влияют на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий за счет источника пула НАДН в матриксе митохондрий [7-9]. Можно предположить, что препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут предотвращать нарушения биоэнергетических функций этих органелл и, следовательно, нарушения энергетического метаболизма клетки. В наших исследованиях мы обратили внимание на доноров оксида азота. Такой выбор

объекта исследования связан с тем, что оксид азота представляет собой сигнальную молекулу, участвующую в самых разнообразных физиологических процессах в растениях [10]. При этом различными исследованиями показано наличие положительной корреляции между увеличением содержания NO в различных органах и тканях растений при стрессовых воздействиях и адаптацией растений к изменяющимся условиям внешней среды [11,12]. Способность NO стимулировать адаптивные реакции, в условиях абиотического стресса, может быть связана с тем, что он может связывать свободные ионы железа в составе нитрозильных комплексов, что, возможно, будет приводить к ингибированию реакций свободно-радикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа [13]. Таким образом, NO может действовать как антиоксидант, хотя возможен и синергизм в действии NO и H₂O₂ [14].

Как показано в ряде работ, обработка растений экзогенными донорами NO регулирует устойчивость к абиотическому стрессу [15]. В нашей работе в качестве донора оксида азота мы использовали натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) – [Na₂[Fe₂(S₂O₃)₂(NO)₄]₂ × 4H₂O (кристаллический ТНКЖ-тио) [16].

В связи с этим исследовано влияние ТНКЖ-тио и стрессовых воздействий (дефицита воды и высокотемпературного стресса) на жирнокислотный состав липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха и их биоэнергетические характеристики.

Поскольку энергетический обмен играет важную роль в адаптивных процессах и митохондрии растений являются источниками и мишенью для оксида азота. Целью нашего исследования было изучение влияния стресса (дефицит воды и тепловой шок) на функциональное состояние митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха.

Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт – Флора 2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO₄. Контрольную группу семян в течение 1 часа замачивали в воде, а опытную группу – в 10⁻⁶М растворе ТНКЖ-тио.

Дефицит воды. Спустя 1 час все семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. После этого половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные ТНКЖ-тио (ДВ+ТНКЖ), на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Спустя 2 суток все проростки переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они оставались в течение последующих 2 суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Тепловой стресс. Спустя 1 час семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где их проращивали в течение 5 суток в темноте при температуре 22°. Затем половину проростков контрольной группы (ТС) и проростки, обработанные ТНКЖ-тио (ТС+ТНКЖ) на 120 мин. помещали в термостат при температуре 45°. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток при температуре 22°. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатом. Кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) [Na₂[Fe₂(S₂O₃)₂(NO)₄]₂ × 4H₂O (ТНКЖ-тио) синтезирован в ФГБУН Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка) [16].

Содержание NO в эпикотилиях 5-дневных этиолированных проростков гороха анализировали по методу, описанному в [17]. Определение его концентрации проводили по реакции Грисса. Навеску 60 г эпикотилей гомогенизировали на льду в 50 мМ ацетатном буфере (pH 3,6) с добавлением 4% ацетата цинка. Гомогенат центрифугировали при 8000g в течение 15 мин, затем к 10 мл супернатанта добавляли 150 мг древесного угля. Смесь фильтровали через бумажный фильтр, после чего смешивали 2 мл фильтрата с 1 мл 1% реактива Грисса в 12% уксусной кислоте и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 540$ нм. В качестве стандарта использовали растворы нитрита натрия.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков проводили методом дифференциального центрифугирования [18]. Первое центрифугирование – при 25000 g в течение 5 мин. Второе – при 3000 g в течение 3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KН₂РO₄ (pH 7,4), 0,1% БСА, (свободный от жирных кислот), и вновь осаждали митохондрии при 11000g в течение 10 мин.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ KН₂РO₄, 4 мМ MgCl₂, и 0,1% БСА.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [19]. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре “Fluoro-Max-HoribaYvon GmbH”, Германия. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). МЭЖК были получены путем кислотного метанолиза липидов мембран митохондрий [20,21]. МЭЖК экстрагировали гексаном, и полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава МЭЖК Количественное определение МЭЖК проводили с использованием хроматографа Kristall 2000M (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой

капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм, фирма J & W Scientific», США). Анализ МЭЖК проводили при программировании температуры от 120 до 270 °С со скоростью 4 °С / мин. Температура инжектора и детектора – 270 °С; скорость газа-носителя гелия составляла 2,0 мл / мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Каждый образец содержал 2 мкл гексанового экстракта. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали, как отношение площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков всех найденных МЭЖК [22]. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическая обработка результатов проводилась с использованием Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификацию МЭЖК проводили на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных газо-хроматографическому анализу с использованием прибора Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры были получены в режиме электронного удара при напряжении ионизации 70 эВ и скорости сканирования 1°С на декаду масс в области 40-400 а.е.м.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2-3 мг белка) помещали в 0,5 мл среды, содержащей: 0,1 М сахарозу, 10 мМ HEPES, 1 мМ K_2HPO_4 , pH 7,4. Митохондрии инкубировали 20-25 мин при комнатной температуре.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$. Обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ (Merck, Германия), сахароза, Трис, (Sigma- Aldrich, США), БСА (свободный от жирных кислот), FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон), ротенон, антимицин А, N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD), аскорбат (Sigma- Aldrich, США), дитиотреитол (AppliChem), карбонат калия, (Merck, Германия), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия), HEPES (4 (2-Гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота) (MB Biomedicals, Германия).

Исследование влияния дефицита воды, теплового стресса и комплекса железа с тиосульфатом на функциональное состояние митохондрий проростков гороха проводили, используя ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-6}M , т.е. в той концентрации, в которой препарат предотвращал активацию ПОЛ на модели «старения» митохондрий [23].

Тепловой стресс и дефицит воды увеличивали флуоресценцию продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий в 2-3 раза (рис. 1). Обработка семян гороха 10^{-6}M раствором ТНКЖ-тио предотвращала активацию ПОЛ, как в условиях дефицита воды, так и в условиях теплового стресса, что, вероятно, свидетельствовало о наличии у препарата протекторных свойств.

Активация ПОЛ, обусловленная стрессом, по-видимому, должна была влиять на жирнокислотный состав мембран митохондрий. Действительно, стрессовые воздействия изменяли пул жирных кислот (ЖК), содержащих 18 и 20 атомов углерода. Содержание линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий проростков, находящихся в условиях дефицита воды (ДВ) снизилось на 6% и 14% соответственно. При этом индекс ненасыщенности C_{18} ЖК почти не изменился, а $\sum \text{C}_{18}$ ненасыщенных ЖК / $\sum \text{C}_{18:0}$ ЖК в этих условиях сократилось с $16,26 \pm 1,25$ до $10,28 \pm 0,92$ (рис. 2).

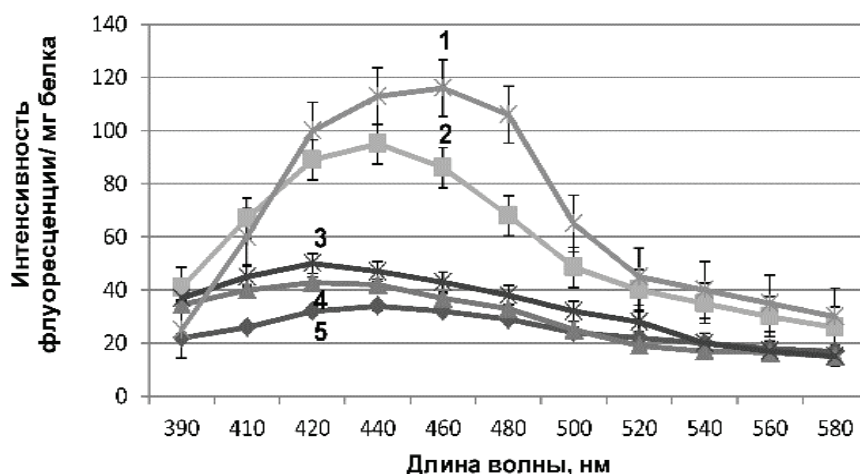


Рисунок 1. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ), теплового стресса (ТС) и обработки семян гороха ТНКЖ-тио. По оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных ед./мг белка, по оси абсцисс – длина волны в нм. 1 – ТС; 2 – ДВ; 3 – ТС+ 10^{-6}M ТНКЖ-тио; 4 – ДВ+ 10^{-6}M ТНКЖ-тио; 5 – контрольная группа проростков

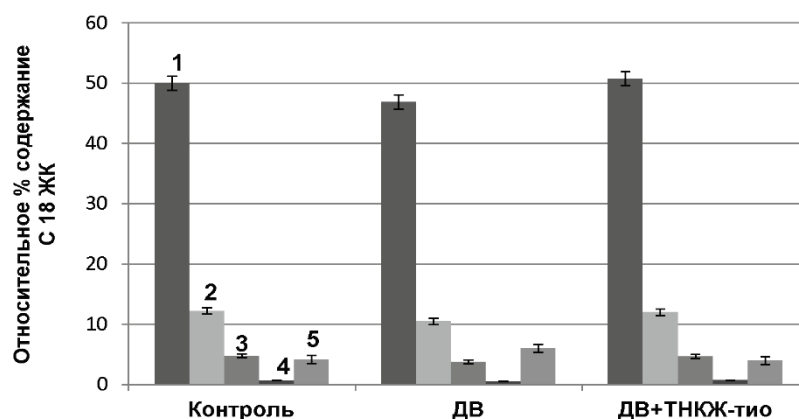


Рисунок 2. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное процентное содержание жирных кислот C_{18} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось Y: относительное % содержание жирных кислот C_{18} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось X: группы проростков; 1 – 18:2 ω_6 ; 2 – 18:3 ω_3 ; 3 – 18:1 ω_9 ; 4 – 18:1 ω_7 ; 5 – 18:0

Сопоставимые с этими данными изменения ЖК состава в условиях дефицита воды наблюдали в мембранах митохондрий кукурузы, липидов мембран суспензионной культуры картофеля и липидов из листьев *Arabidopsis thaliana* [24-26]. При этом авторы отмечали, что дефицит воды приводил и к увеличению содержания стеариновой кислоты в мембранах и снижению содержания линолевой и линоленовой кислот. Отметим, что наблюдаемое 10% снижение содержания олеиновой кислоты в мембранах митохондрий, возможно, объясняется не только активацией ПОЛ, но и снижением активности ацил-липидных ω_9 -десатураз. В условиях теплового стресса также наблюдалась модификация пула C_{18} жирных кислот. При этом происходило снижение содержания линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий проростков на 7,73% и 18% соответственно [27]. Также как и в условиях дефицита воды, индекс ненасыщенности C_{18} ЖК почти не изменился, а $\sum C_{18}$ ненасыщенных ЖК / $\sum C_{18:0}$ ЖК уменьшалось почти в 1,6 раза (с $16,37 \pm 1,20$ до $10,45 \pm 0,81$). Соизмеримое снижение содержания полиненасыщенных ЖК, в частности в содержании C_{18} ЖК при температурном стрессе наблюдали и у *Arabidopsis thaliana* [28,29]. Отметим, что более значительное снижение содержания полиненасыщенных C_{18} ЖК кислот в мембранах митохондрий проростков гороха происходило в условиях теплового стресса, а не в условиях дефицита воды и это снижение, вероятно, обусловлено активацией ПОЛ.

В результате стрессовых воздействий происходили значительные изменения и в содержании C_{20-22} ЖК. Индекс ненасыщенности C_{20} ЖК при дефиците воды понизился с $0,095 \pm 0,002$ до $0,057 \pm 0,001$, а содержание насыщенных $C_{20:0+C_{22:0}}$ ЖК уменьшилось в 1,6 раза (рис. 3).

В то же время тепловой стресс вызывал снижение индекса ненасыщенности C_{20} ЖК с $0,087 \pm 0,002$ до $0,067 \pm 0,001$ (уменьшение показателя в 1,3 раза, а содержание насыщенных $C_{20:0+C_{22:0}}$ ЖК даже увеличивалось с $1,21 \pm 0,12$ до $3,50 \pm 0,22$).

Изменения физико-химических характеристик мембран митохондрий, вероятно, должны были влиять на липид-белковые взаимодействия и, следовательно, на активность, ассоциированных с мембранами митохондрий ферментов. Действительно, стрессовые воздействия приводили к снижению скоростей окисления НАД-зависимых субстратов (табл. 1).

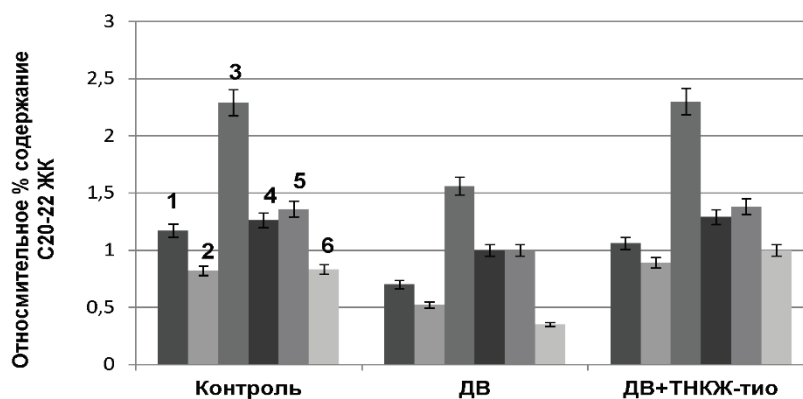


Рисунок 3. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное % содержание C_{20-22} ЖК в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось Y: относительное % содержание жирных кислот C_{20-22} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось X: группы проростков; 1 – 20:3 ω_6 ; 2 – 20:2 ω_6 ; 3 – 20:1 ω_9 ; 4 – 20:1 ω_7 ; 5 – 20:0; 6 – 22:0

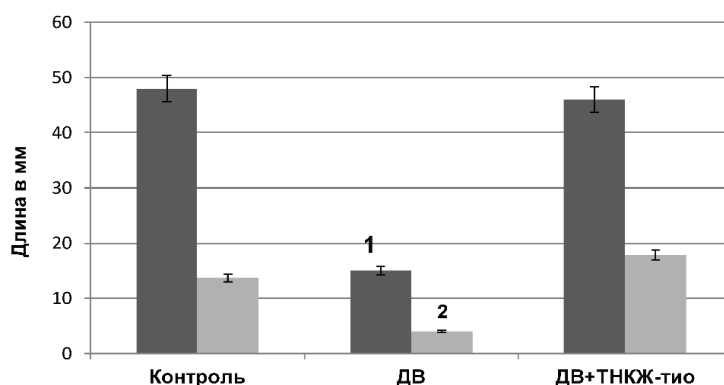


Рисунок 4. Влияние дефицита воды (ДВ) и обработки семян гороха ТНКЖ-тио на длину побегов и корней 5-дневных проростков. 1 – побег; 2 – корни

Действительно, максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов снижались на 36% в условиях дефицита воды и на 44% при тепловом стрессе. При этом эффективность окислительного фосфорилирования снижалась в 1,32 и 1,52 раза. Обработка семян гороха 10^{-6} М ТНКЖ-тио восстанавливала максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов как в присутствии АДФ, так и в присутствии разбавителя. Однако эти скорости были ниже контрольных значений, что, возможно, объясняется конкуренцией оксида азота и кислорода за места связывания с цитохромоксидазой [30].

Действительно, обработка семян гороха препаратом приводила к увеличению содержания NO в тканях растений. Так содержание оксида азота в тканях эпикотилей проростков, выращенных из семян обработанных ТНКЖ-тио в условиях дефицита воды было в 1,68 раз выше ($65,0 \pm 2,5$ нмоль/г. сырого веса), чем у не обработанных проростков, находящихся в тех же условиях ($38,7 \pm 1,9$ нмоль/г. сырого веса).

Изменения функционального состояния митохондрий отразились и на физиологических показателях – на росте проростков. Обработка семян гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста побегов и корней проростков. При этом длина корней проростков в условиях дефицита воды была даже в 1,3 раза больше, чем у проростков, находящихся в стандартных условиях, что имеет важное значение для адаптации растений в условиях дефицита воды.

Таким образом способность натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитозилдиферрат тетрагидрата повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов, вероятно, связана с его антиоксидантными свойствами. Эти свойства, по-видимому, обусловлены тем, что препарат донирует оксид азота. Действительно, экспериментальное сравнение антиоксидантных свойств ТНКЖ-тио с эффективностью NO, растворенного в воде, при тех же условиях показало, что антиоксидантная активность препарата определяется действием NO, выделяющегося при гидролизе ТНКЖ-тио [31]. Выделяющийся оксид азота способен модифицировать белки (в том числе антиоксидантные ферменты). Кроме того, благодаря нитрованию тирозина в белках NO может изменять активность супероксиддисмутазы (СОД) [32]. Более того, по мнению некоторых авторов, в результате S-нитрозилирования может происходить изменение состояния факторов, регулирующих транскрипцию антиоксидантных ферментов [16, 33]. При этом одним из механизмов антиоксидантного действия NO является, возможно, связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов, аналогичное наблюдаемому в клетках животных и бактерий [13].

Таблица 1. Влияние ТНКЖ-тио, дефицита воды или теплового стресса (ТС) на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха. Скорости окисления представлены в виде нг.атом O_2 /мг белка \times мин. Число повторов – 8

Группа	V_2	V_3	V_4	V_3/V_4	ДНФ
Контр	$23,21 \pm 2,21$	$78,53 \pm 1,70$	$34,44 \pm 1,52$	$2,28 \pm 0,01$	$70,95 \pm 1,88$
ДВ	$36,05 \pm 1,24$	$50,20 \pm 2,80$	$29,88 \pm 1,23$	$1,68 \pm 0,01$	$46,00 \pm 1,32$
ДВ+ 10^{-6} М ТНКЖ-тио	$25,68 \pm 1,9$	$69,88 \pm 2,00$	$25,50 \pm 1,72$	$2,74 \pm 0,02$	$62,94 \pm 1,41$
ТС	$35,00 \pm 2,41$	$41,25 \pm 1,81$	$27,32 \pm 1,83$	$1,50 \pm 0,03$	$40,81 \pm 1,54$
ТС+ТНКЖ- тио	$22,41 \pm 1,35$	$65,41 \pm 2,00$	$32,86 \pm 1,42$	$1,99 \pm 0,05$	$60,43 \pm 1,68$

Среда инкубации: 0,4 М сахароза, 20 мМ HEPES-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ $MgCl_2$, и 0,1% БСА, 10мМ малаг, 10мМ глутамат. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилицианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразон). Условные обозначения

V_2 - скорости окисления субстратов;

V_3 - скорости окисления субстратов в присутствии АДФ;

V_4 - скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ)

Предотвращая окисление ненасыщенных C₁₈ ЖК, главным образом линолевой и линоленовой – основных ЖК, входящих в состав кардиолипина – одного из основных фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий, препарат обеспечивает эффективную работу дыхательной цепи митохондрий [34].

При этом большое значение в сохранении функциональной активности этих органелл в стрессовых условиях, вероятно, имеет и сохранение пула ненасыщенных ЖК, содержащих 20 атомов углерода. Роль этих ЖК в устойчивости растений к стрессу еще мало изучена, но в некоторых случаях показано их участие в реакции растений на неблагоприятные воздействия. Так было обнаружено, что увеличение пула C₂₀ ЖК имело значение при адаптации растений к осмотическому стрессу, вызванному засолением [35]. Следует отметить, что изменения в составе и количестве ЖК с очень длинной цепью или (ЖКОДЦ) (C₂₀₋₂₄) в восках, фосфолипидах и сложных сфинголипидах в совокупности оказывают глубокое влияние на развитие эмбрионов, листьев, корней и цветков. Фосфолипиды и сфинголипиды ЖКОДЦ участвуют в структуре и динамике мембран, регулируя размер клеток, а также деление и дифференцировку [36,37], они также могут оказывать влияние на биогенез митохондрий.

Предотвращая окисление ненасыщенных жирных кислот, ТНКЖ-тио способствует сохранению функциональной активности митохондрий, а, следовательно, поддержанию энергетического метаболизма клетки, что особенно важно для прорастающих семян, нуждающихся в энергетических ресурсах.

Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику ФГБУН Института проблем химической физики РАН (Черноголовка) Саниной Н.А. за предоставление для исследований образцов натрия μ2-дитиосульфата – тетранитрозилдиферрат тетрагидрата.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 44.4-44.5 1201253310).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Список литературы / References:

1. Иванова Т.В., Воронков А.С., Кузнецова Э.И., Кумахова Т.Х., Жиров В.К., Цыдендамбаев В.Д. Жирные кислоты липидов перикарпия *Cydonia oblonga* Mill. и *Mespilus germanica* L. вовлекаются в адаптацию растений к условиям высотной поясности. *ДАН*, 2019, т. 486, № 5, с. 620-625. [Ivanova T.V., Voronkov A.S., Kuznetsova E.I., Kumakhova T.Kh., Zhirov V.K., Tsydendambaev V.D. Fatty acids of lipids of the pericarp of *Cydonia oblonga* Mill. and *Mespilus germanica* L. are involved in plant adaptation to altitudinal zonality. *Reports of the Russian Academy of Sciences*, 2019, vol. 486, no. 5, pp. 620-625, doi: 10.31857/S0869-56524865620-625. (In Russ.)]
2. Живетьев М.А., Граскова И.А., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Войников В.К. Изменение жирнокислотного состава растений при гипотермической адаптации. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2010, т. 6, № 4, с. 51-65. [Zhivetiev M.A., Graskova I.A., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Voinikov V.K. Changes in the fatty acid composition of plants during hypothermic adaptation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2010, vol. 6, no 4, pp. 51-65. (In Russ.)]
3. Hou Q., Ufer G., Bartels D. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, 2016, vol. 39, no. 5, pp. 1029-48, doi: 10.1111/pce.12666.
4. Okazaki Y, Saito K. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.*, 2014, vol. 79, no. 4, pp. 584-96, doi: 10.1111/tpj.12556.
5. Грабельных О.И., Кириченко К.А., Побежимова Т.П., Боровик О.А., Павловская Н.С., Любушкина И.В., Королева Н.А., Войников В.К. Устойчивость проростков озимой пшеницы к кратковременному действию отрицательной температуры может быть обусловлена активацией разобщающих белков и АТФ/АДФ антипортера. *Биол. мембраны*, 2014, т. 31, № 3. [Gabelnykh O.I., Kirichenko K.A., Pobezhimova T.P., Borovik O.A., Pavlovskaya N.S., Lyubushkina I.V., Koroleva N.A., Voinikov V.K. wheat to a short-term exposure to negative temperatures may be due to the activation of uncoupling proteins and the ATP/ADP antiporter. *Biol. Membranes*, 2014, vol. 31, no. 3. (In Russ.)]
6. Pastore D. The Enigmatic Metabolite Transport in Plant Mitochondria Lacking Proton Motive Force – news from Durum Wheat Mitochondria. *Bioenergetics*, 2014, vol. 3, no 3, pp. 121-122, doi: 10.4172/2167-7662.1000e121.
7. Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med. Longev.*, 2014, vol. 2014, pp. 2-67, doi: 10.1155/2014/360438.
8. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential Impact of Environmental Stresses on the Pea Mitochondrial Proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2005, vol. 4, no. 8, pp. 1122-1133, doi: 10.1074/mcp.M400210-MCP200.
9. Zhigacheva I.V., Burlakova E. B. Plant Growth and Development Regulators and Their Effect on the Functional State of Mitochondria. *Chemistry and Technology of Plant Substances. Chemical and Biochemical Aspects/* Ed. Ed Kutchin A.V., Shishkina L.N., Weisfeld L.I. Oakville: Apple Academic Press, 2017, chapter 12, pp. 243-278, doi: 10.1201/9781315207469-15.
10. Мамаева А.А., Фоменков А.В., Носов И.Е., Мошков Л.А., Мур Ж., Холл М.А., Новикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота в растениях. *Физиол. Растений*. 2015, т. 62, № 4, с. 459-474. [Mamaeva A.A., Fomenkov A.V., Nosov I.E., Moshkov L.A., Moore Zh., Hall M.A., Novikova G.W. Regulatory role of nitric oxide in plants. *Physiol. Plants*, 2015, vol. 62, no. 4, pp. 459-474, doi: 10.7868/S0015330315040132. (In Russ.)]

11. Shi H., Ye T., Zhu J.K., Chan Z. Constitutive production of nitric oxide leads to enhanced drought stress resistance and extensive transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 2014, vol. 65, pp. 4119-4131, doi: 10.1093/jxb/eru184.
12. Nabi R.B.S., Tayade R., Hussain A., Kulkarni K.P., Imran Q.M., Bong-Gyu Mun. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, vol. 161, pp. 120-133, doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
13. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015, 220 с. [Vanin A.F. *Dinitrosyl complexes of iron with thiol-containing ligands: physical chemistry, biology, medicine*. Moscow-Izhevsk: Institute for Computer Research, 2015, 220 p. (In Russ.)].
14. Hasanuzzaman M.K., Nahar K., Alam Md.M., M. Fujita M. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum L.*) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase. *Australian J. Crop Science*, 2012, vol. 6, no. 8, pp. 1314-1323.
15. Seabra A.B., Oliveira H.C. How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: what we know so far and perspectives. *AIMS Molecular Science*, 2016, vol. 3, no. 4, pp. 692-718, doi: 10.3934/molsci.2016.4.692.
16. Санина Н.А., Алдошин С.М. Структура и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами. *Изв. РАН, Сер., Хим*, 2011, т. 7, с. 1199-1205. [Sanina N.A., Aldoshin S.M. Structure and properties of iron nitrosyl complexes with functional sulfur-containing ligands. *Russian Chemical Bulletin*, 2011, vol. 7, pp. 1199-1205, doi: 10.1007/s11172-011-0192-x. (In Russ.)]
17. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, pp. 3223-3228, doi: 10.1093/jxb/eri319.
18. 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. [Popov V.N., Ruge E.K., Starkov A.A. Influence of inhibitors of electron transport on the formation of reactive oxygen species during the oxidation of succinate by pea mitochondria. *Biochemistry*, 2003, vol. 68, no. 7, pp. 910-916. (In Russ.)]
19. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, 1973, vol. 52, pp. 1-9.
20. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., Sim I.S. Fatty acid determination in chicken egg yolk. A comparison of different methods. *Poultry science*, 2000, vol. 79, pp. 1168-1171, doi: 10.1093/ps/79.8.1168.
21. 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, vol. 151, pp. 384-390.
22. 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. *Chromatogr.*, 1977, vol. 10, no. 9, pp. 545-546, doi: 10.1007/BF02262915.
23. Жигачева И.В., Васильева С.В., Генерозова И.П., М.М. Расулов М.М. Тетранитрозильный биядерный комплекс железа повышает устойчивость проростков гороха и клеток *E. coli* к стрессовым воздействиям. *Биологические мембраны*, 2020, т. 37, № 2, с. 149-153. [Zhigacheva I.V., Vasilyeva, S.V., Generozova I.P., Rasulov M.M. Tetranitrosyl binuclear iron complex increases the resistance of pea seedlings and *E. coli* cells to stress. *Biochemistry (Moscow), supplement series A: Membrane and cell biology*, 2020, vol. 37, no. 2, pp. 149-153 (In Russ.)].
24. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Хотимченко С.В., Коненкина Т.А., Арзиев А.Ш. Жирнокислотный состав липидов митохондриальных мембран у представителей культурных (*Zea Mays*) и дикорастущих (*Elymus Sibiricus*) злаков. *Физиол. растений*, 2013, т. 60, № 2, с. 205-213. [Makarenko S.P., Konstantinov Y.M., Khotimchenko S.V., Konenkina T.A., Arziev A.Sh. Fatty acid composition of mitochondrial membrane lipids in cultivated (*Zea mays*) and wild (*Elymus sibiricus*). *Grasses. Russ J Plant Physiol* 2003, vol. 50, pp. 548-553, doi: 10.1023/A:1024716606132. (In Russ.)]
25. 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, vol. 94, no 3, pp. 345-351, doi: 10.1093/aob/mch150.
26. 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, vol. 19, pp. 1103-1109, doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00218.x.
27. Жигачева И.В., Бинюков В.И., Миль Е.М., Крикунова Н.И., Расулов М.М., Албантова А.А., Генерозова И.П. Натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат повышает устойчивость проростков гороха к тепловому стрессу. *Физиол. Растений*, 2022, т. 69, № 2, с. 198-207. [Zhigacheva I.V., Binyukov V.I., Mil E.M., Krikunova N.I., Rasulov M.M., Albantova A.A., Generozova I.P. Sodium μ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate Prevents Heat Shock-Induced Mitochondria Dysfunction., *Russian Journal of Plant Physiology*, 2022, vol. 69, pp. 38-46 (In Russ.)].
28. Saidi Y., Peter M., Finka A., Cicekli C., Vigh L., Goloubinoff P. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca^{2+} -dependent heat shock response. *Plant Signal Behav*, 2010, vol. 5, no. 12, pp. 1530-1533, doi: 10.4161/psb.5.12.13163.

29. Falcone D.L., Ogas J.P., Somerville Ch.R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol.*, 2004, vol. 4, pp. 17-24, doi: 10.1186/1471-2229-4-17.
30. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Физиологическая роль оксида азота при инфекционном процессе. *Успехи физиологических наук*, 2012, т. 43, № 3, с. 62-81. [Plekhnova N.G., Somova L.M. The physiological role of nitric oxide in the infectious process. *Advances in the physiological sciences*, 2012, vol. 43, no. 3, pp. 62-68. (In Russ.)].
31. Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Смолина А.В., Полетаева Д.А., Солдатова Ю.В., Покидова О.В., Садков А.П., Санина Н.А., Алдошин С.М. Антиоксидантная активность тетранитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами и его влияние на каталитическую активность митохондриальных ферментов в опытах in vitro. *ДАН*, 2019, т. 488, № 5, с. 571-575. [Faingold I.I., Kotelnikova R.A., Smolina A.V., Poletaeva D.A., Soldatova Yu.V., Pokidova O.V., Sadkov A.P., Sanina N.A., Aldoshin S.M. Antioxidant activity of tetranitrosyl iron complex with thiosulfate ligands and its effect on the catalytic activity of mitochondrial enzymes in experiments in vitro. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 488, no. 1, pp. 342-345, doi: 10.1134/S1607672919050120. (In Russ.)]
32. Hancock J.T., Neill S.J. Nitric oxide: Its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* (Basel), 2019, vol. 8, no. 2, pp. 41, doi: 10.3390/plants8020041307598233641.
33. Groß F., Durner J., Gaupels F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci*, 2013, vol. 4, pp. 419, doi: 10.3389/fpls.2013.00419.
34. Oemer G., Lackner K., Muigg K., Krumschnabel G., Watschinger K., Sailer S., Lindner H., Gnaiger E., Wortmann S.B., Werner E.R., Zschocke J., Kelle M.A. Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *PNAS*, 2018, vol. 115, no. 16, pp. 4158-4163, doi: 0.1073/pnas.1719407115.
35. Цыдендабаев В.Д., Иванова Т.В., Халилова Л.А., Куркова Е.Б., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Жирнокислотный состав липидов вегетативных органов галофита *Suaeda Altissima* при разном уровне засоления. *Физиология растений*, 2013, т. 60, с. 700-711. [Tsydenbabaev V.D., Ivanova T.V., Khalilova L.A., Kurkova E.B., Myasoedov N.A., Balnokin Yu.V. Fatty acid composition of lipids in the vegetative organs of the halophyte *Suaeda Altissima* at different levels of salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2013, vol. 60, no. 5, pp. 661-671, doi: 10.1134/S1021443713050142. (In Russ.)]
36. Bach L., Faure J.D. Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C R Biol.*, 2010, vol. 333, no. 4, pp. 361-370, doi: 10.1016/j.crv.2010.01.014.
37. Bach L., Gissot L., Marion J. et al. Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell. Sci.*, 2011, vol. 124, no. 19, pp. 3223-3234, doi: 10.1242/jcs.074575.

ETRANITROSYL IRON COMPLEX WITH THIOSULFATE LIGANDS PREVENTS MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION UNDER STRESS

Zhigacheva I.V.¹, Krikunova N.I.¹, Generozova I.P.², Butsanets P.A.², Vasilyeva S.V.¹, Rasulov M.M.³

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics. of RAS,

Kosygina str. 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology named of RAS,

Botanicheskaya str. 35, Moscow, 127276, Russia; e-mail: igenerozova@mail.ru

³ State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Connections

Entuziastov w. 38, Moscow, 105118, Russia; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Received 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0477

Abstract. The effect of stress (water deficiency, high-temperature stress) and nitric oxide donor sodium μ 2-dithiosulphate-tetranitrosyldiferrate tetrahydrate $\text{Na}_2 [\text{Fe}_2 (\text{S}_2\text{O}_3)_2 (\text{NO})_4]_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (TNIC-thio) on the fatty acid composition and bioenergetic characteristics of 5-day etiolated pea seedling mitochondria was studied. Stressful effects caused the activation of LPO in the mitochondrial membranes. At the same time, significant changes occurred in the content of C_{18} and C_{20} fatty acids (FA). A decrease in the content of linoleic and linolenic acids, one of the main FA components of cardiolipin in higher plants, apparently caused a decrease in the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates. The treatment of pea seeds with 10^{-6}M TNIC-thio prevented the activation of LPO, changes in the fatty acid composition of mitochondrial membranes, and contributed to the preservation of the bioenergetic characteristics of these organelles. By preventing the decline in energy metabolism, TNIC-thio probably has adaptogenic properties, that were also reflected in physiological parameters, namely, the growth of seedlings. Treatment of pea seeds and seedlings with the studied preparation prevented inhibition of root and shoot growth in conditions of water deficiency. Based on the data obtained, it can be concluded that the protective properties of TNIC-thio are due to its antioxidant activity.

Key words: nitric oxide donors, water deficiency, heat stress, mitochondria, fatty acids.