

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОПРЕДЕЛЯЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

Жигачева И.В., Бинюков В.И., Миль Е.М.
ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ
e-mail: zhigacheva@mail.ru

Аннотация. Водный дефицит, активируя перекисное окисление липидов, приводит к снижению содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК) с 18 атомами углерода в мембранах митохондрий проростков гороха. Этот процесс сопровождается снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и скоростей транспорта электронов на конечном участке дыхательной цепи, а также набуханием митохондрий. Введение в среду инкубации митохондрий 5×10^{-6} М цитохрома С восстанавливало скорости транспорта электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи. Такой же результат был получен при обработке семян гороха 2×10^{-12} М мелафеном (меламиновой солью бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты). Мелафен предотвращал набухание митохондрий и снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. Предполагается, что нарушение биоэнергетических характеристик митохондрий в условиях водного дефицита, по-видимому, обусловлено окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, и, следовательно, снижением содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий. Мелафен, предотвращая ПОЛ, восстанавливает функциональную активность митохондрий, обеспечивая повышение устойчивости проростков к водному дефициту.

Ключевые слова: митохондрия, перекисидация липидов, кардиолипин, жирные кислоты.

THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA DETERMINES THE RESISTANCE OF PEA SEEDLINGS TO WATER DEFICIT

Zhigacheva I.V., Binyukov V.I., Mil' E.M.
Institute of Biochemical Physics: N.M. Emanuel, Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: zhigacheva@mail.ru

Abstract. Water deficiency, triggering lipid peroxidation, leads to a decrease in the content of unsaturated fatty acids (FA) with 18 carbon atoms in the membranes of mitochondria pea seedlings. This process is accompanied by a decrease of maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates and electron transport rates to the end site of the respiratory chain, also mitochondrial swelling. Introduction to the incubation medium of mitochondria 5×10^{-6} M cytochrome c restored of electron transport rates in the terminal site of respiratory chain. The same result was obtained in the processing of peas 2×10^{-12} M. Melaphen (melamine salt of bis (oxymethyl)-phosphinic acid). Melaphen prevented mitochondrial swelling and reduces the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates. It is assumed that the violation of bioenergetic characteristics of mitochondria in conditions of water deficiency, apparently connected with the oxidation of unsaturated fatty acids included in the composition of cardiolipin, mainly linoleic acid, and therefore by reducing the content of this phospholipid in the inner mitochondrial membrane. Melaphen, preventing lipid peroxidation, restores functional activity of mitochondria, providing increased resistance of seedlings to water deficiency.

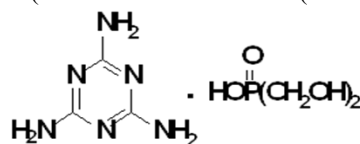
Key words: mitochondria, lipid peroxidation, cardiolipin, fatty acids

Митохондрии, являясь «энергетическими станциями» клеток, играют одну из основных ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов [1]. Изменения, происходящие в окружающей среде, приводят к перестройкам в липидном составе мембран митохондрий. При этом изменяется количество и степень насыщенности жирных кислот, что, возможно, является сигналом действия стрессового фактора [2]. Жирные кислоты (ЖК), главным образом ненасыщенные, определяют периодичность колебаний объема митохондрий. Например, большая гибкость и эластичность мембран морозоустойчивых растений, содержащих повышенное количество ненасыщенных жирных кислот, позволяют митохондриям активно изменять объем в широком диапазоне температур, что обеспечивает клетке более высокий энергетический потенциал. Сходные данные известны также для растений, устойчивых к другим воздействиям: высокой температуре, засухе, инфекции, этанолу [3]. Линолевая кислота, являющаяся одной из основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина – фосфолипида, обеспечивающего эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий за счет образования достаточно тесных контактов между дыхательными комплексами с образованием суперкомплексов [4].

Стрессовые факторы приводят к смещению антиоксидантно–прооксидантного равновесия в сторону увеличения продукции АФК, что вызывает развитие ряда патологических состояний [5], обусловленное повреждением компонентов клетки. Основным источником АФК в этих условиях являются митохондрии у животных [6], митохондрии и хлоропласты у растений [7]. Установлено, что повреждающее действие активных форм кислорода на дыхательную активность связано с их действием на кардиолипин, который необходим для нормального функционирования ферментных комплексов [8]. Кроме того, перекисидация липидов мембран и,

прежде всего кардиолипина приводит к окислению тиоловых групп белков набуханию митохондрий, выходу цитохрома С и, возможно, к индукции апоптоза [9].

Исходя из этого, можно было предположить, что препараты, обладающие адаптогенными свойствами в первую очередь должны влиять на генерацию АФК митохондриями и хлоропластами. В своей работе мы обратили внимание главным образом на митохондрии, так как эти органеллы, как у растений, так и у животных играют одну из основных ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов. Так как регуляторы роста и развития растений (РРР) повышают устойчивость растений к действию стрессовых факторов [10], можно было предположить, что они могут влиять на генерацию АФК митохондриями. В качестве объекта исследования был выбран препарат мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты)



Мелафен

Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий [11] интересно было выяснить, как этот РРР влияет на функциональное состояние митохондрий проростков гороха, подвергнутых 2-х дневному водному дефициту. Проверку протекторных свойств препарата проводили, используя 2×10^{-12} М мелафен т.е. в той концентрации, в которой этот РРР снижал интенсивность ПОЛ до контрольных значений [12].

Материалы и Методы. Работу проводили на митохондриях 6 дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа.

При этом семена гороха промывали водой с мылом и 0.01 % раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 30 мин. замачивали в воде, а опытную группу – в 2×10^{-12} М растворе мелафена. Затем семена помещали на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте при температуре 24°C . Спустя 2 суток, половину семян контрольной группы (НУ) и семена, обработанные мелафеном (НУ+МФ) переносили на сухую фильтровальную бумагу. Спустя 2 суток водного дефицита семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение ближайших двух дней при 24°C . Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 6 суток. На шестые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 г в течение 5 мин и при 3000 г в течение 3 мин) [13]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 г. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (рН 7,4), 0,1 % БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 г 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 HEPES-Tris-буфер (рН 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , и 0,1 % БСА.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом, используя спектрофлуориметр «FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия) [14]. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [15].

Идентификацию МЭЖК проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и по величинам индексов удерживания [16].

Определение количественного состава МЭЖК проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м \times 0.32 мм, слой 0.25 мкм). Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали, как отношение площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК.

Образцы митохондрий для 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 150кГц в полуконтактном режиме, использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10нм. Некоторые геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя “Image Analysis”. Сечение производили на высоте 30 нм. Объем имиджа митохондрий исследуемых препаратов митохондрий соответствовал произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Недостаточное увлажнение имело следствием активацию свободно радикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует

3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (см. рис. 1). Отметим, что обработка семян гороха исследуемым РРР приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ.

Активация ПОЛ вызывала значительные изменения в содержании C_{18} и C_{20} ЖК в мембранах митохондрий. Соотношение суммарного содержания C_{18} ненасыщенных ЖК к содержанию стеариновой кислоты снижалось с $16,61 \pm 0,30$ до $10,59 \pm 0,20$, а соотношение $20:1\omega7 + 20:1\omega9 + 20:2\omega6/C20:0$ снизилось с $3,65 \pm 0,03$ до $1,20 \pm 0,16$.

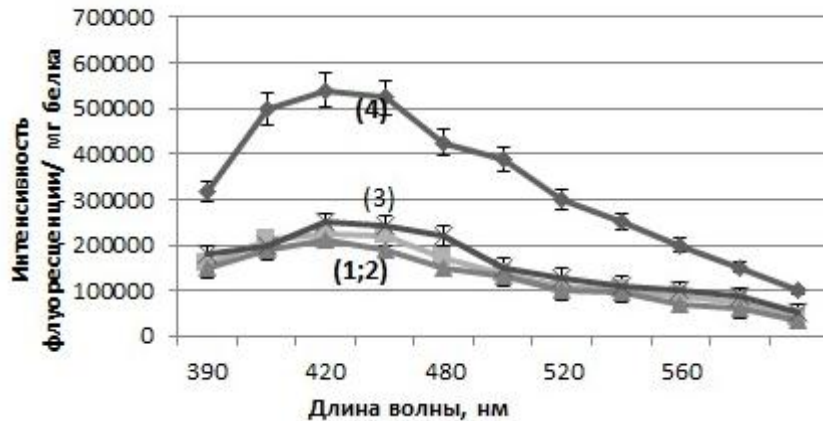


Рисунок 1 – Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 6-дневных этиолированных проростков гороха в условиях недостаточного увлажнения (НУ) и обработки семян мелафеном (МФ), контроль; 2 - НУ+МФ(2×10^{-12} М); 3 - НУ+МФ(2×10^{-9} М); 4 – НУ

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождалось 30 % снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25 % снижением эффективности окислительного фосфорилирования (см. табл. 1).

Таблица 1 – Влияние недостаточного увлажнения (НУ) и мелафена (МФ) на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха, нг-моль / (мг белка мин)

Группа	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	ДК	FCCP
Контроль	25.0±1.0	70.0±3.1	29.8±2.0	2.35±0.01	74.1±3.8
НУ	15.0±2.1	50.6±2.5	29.9±1.0	1.67±0.02	51.0±2.2
НУ+МФ (2×10^{-12} М)	21.8±2.0	72.0±2.4	28.6±1.3	2,52± 0.01	76.5±4.1

Среда инкубации: 0,4 М сахараза, 20 мМ НЕРЕС-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ $MgCl_2$, и 0,1% БСА, 10мМ малат, 10 мМ глутамат. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-р-трифторметоксифенил-гидразон).

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 мембране митохондрий [17]. Подтверждением этому предположению является 2-кратное снижение скоростей транспорта электронов на конечном цитохромоксидазном участке дыхательной цепи митохондрий проростков гороха, находящихся в условиях дефицита воды (см. рис.2). 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, обусловленной окислением кардиолипина во внутренней мембране этих органелл. В пользу данного предположения также свидетельствуют и данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ имиджи митохондрий проростков гороха, подвергшихся двухдневному водному дефициту, существенно изменяются и отличаются от контрольных образцов. Статистический анализ объема предварительно фиксированных, глутаровым альдегидом митохондрий свидетельствует о появлении одиночных, не делящихся митохондрий большего объема в группе проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало о набухании митохондрий (см. табл. 2).

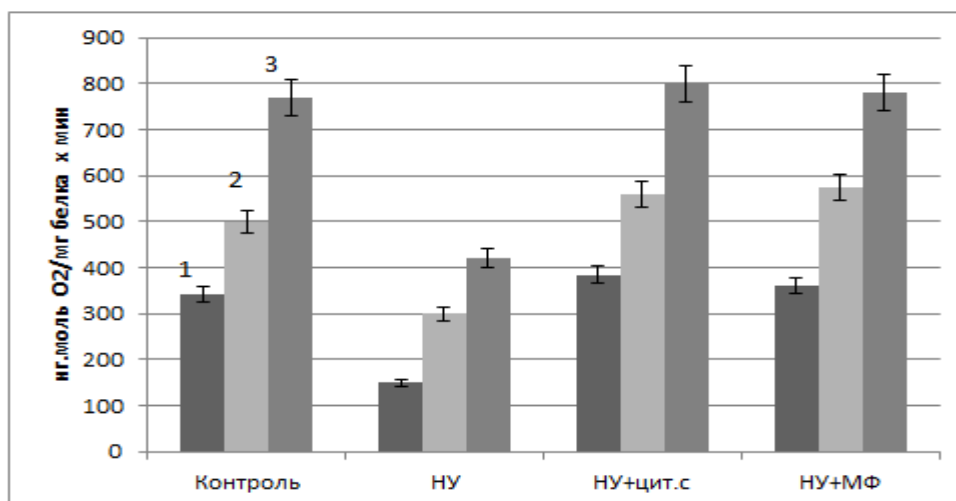


Рисунок 2 – Скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД митохондриями проростков гороха. Среда инкубации содержала: 0,4 М сахараза, 10 мМ аскорбат, 60 мкМ ротенон, 5мкМ антимицин А, 0,5 мкМ FCCP. 1-200 мкМ ТМФД (N,N,N',N'-тетраметил - p-фенилендиамин); 2- 400 мкМ ТМФД; 3- 600 мкМ ТМФД. Цитохром с добавляли в среду инкубации в концентрации 5×10^{-6} М.

Таблица 2 – Влияние дефицита воды и мелафена (2×10^{-12} М) на объем (V) АСМ-имиджей митохондрий проростков гороха

Группа	Среднее значение V, (μm) ² × nm	95 %	-95 %
Контроль	81.05	92.11	69.99
НУ+МФ	86.43	94.51	78.38
НУ	115.13	127.23	103.03

Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена предотвращало изменения морфологии митохондрий. Размеры митохондрий приближались к контрольным. При этом происходило снижение содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня (см. рис.1). Обработка мелафеном, защищая от перекисного окисления ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран, предотвращала изменения в жирнокислотном составе мембран, проростков выращенных в условиях недостаточного увлажнения (НУ+МФ). Содержание C₁₈ ненасыщенных ЖК, играющих важнейшую роль в устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды [18], оставалось на уровне контрольных значений. Не отличалось от контрольных величин и относительное содержание C₂₀ жирных кислот.

Изменения в жирнокислотном составе мембран митохондрий сопровождались изменениями в максимальных скоростях окисления НАД-зависимых субстратов. При этом сохранялись высокие скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP и предотвращало снижение эффективности окислительного фосфорилирования, обусловленное дефицитом воды (см. табл. 1).

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. Обработка семян гороха мелафеном предотвращала снижение темпа роста корней. Длина корней проростков гороха в условиях водного дефицита почти не отличалась от соответствующих показателей контрольной группы растений. При этом длина побегов также не отличалась от контрольных величин.

Таким образом мелафен предотвращая перекисидацию фосфолипидов, главным образом кардиолипина, по-видимому, предупреждает диссоциацию суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий [19], обеспечивая эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий. Это, вероятно, обеспечивает устойчивость растений к действию стрессовых факторов.

Список литературы / References:

1. Грабельных О.И. Энергетические функции митохондрий растений в стрессовых условиях. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 2005, т. 1, № 1, с. 38-54. [Grabelnych O.I. The energetic functions of plant mitochondria under stress conditions. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 2005, vol. 1, no. 1, pp. 38-54. (In Russ.)]
2. Войников В.К. Ядерно-митохондриальные взаимоотношения при редокс-регуляции экспрессии генов растений при стрессах. *Матер. Всероссийского симпозиума «Растение и стресс»*, М., 2010, с. 90-91.

[Voynikov V.K. Nuclear-mitochondrial interaction involved in redox-regulation of expression of plant genes of under stress. *Proceedings of the Russian conference "Plant and Stress"*, Moscow, 2010, pp. 90-91. (In Russ.)]

3. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям. *СОЖ*, 1997, № 9, с. 12-17. [Chirkova T.V. Cell membranes and plant resistance to stress factors. *Soros educational journal*, 1997, no. 9, pp. 12-17. (In Russ.)]

4. Kang S.Y., Gutowsky H.S., Hsung J.C., Jacobs R., King T.E., Rice D., Oldfield E. Nuclear magnetic resonance investigation of the cytochrome oxidase-phospholipid interaction: a new model for boundary lipid. *Biochemistry (Mosc.)*, 1979, vol. 18, no. 15, pp. 3257-3267.

5. Tailor N.L., Day D.A., Millar A.H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. of Exp. Botany*, 2003, vol. 55 (394), pp. 1-10.

6. Plotnikov E., Chupyrkina A., Vasileva A., Kazachenko A., Zorov D. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the pathogenesis of acute renal failure. *BBA*, 2008, vol. 1777, pp. S58-S59.

7. Rodríguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología Aplicada*, 2005, vol. 22, no. 1, pp. 1-10.

8. Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *BBA*, 2014, vol. 1837, no. 4, pp. 427-443.

9. Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, 1980, vol. 17, no. 1, pp. 173-249.

10. Чалова Л.И., Озерецковская О.Л., Березина И.В. Биологические индукторы защитных реакций растений и возможные пути их практического использования. Биохимия иммунитета, покоя, старения растений. М: Наука, 1984, 57 с. [Chalova L.I., Ozeretskovskaya O.L., Berezin I.V. Biological inductors of protective reactions of plants and possible ways of their practical use. *Biochemistry of immune system, of rest, ageing of plants*. Moscow: Nauka, 1984, 57 p. (In Russ.)]

11. Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И., Орехова С.О., Шугаев А.Г. Влияние водного дефицита на дыхание проводящих пучков листового черешка сахарной свеклы. *Физиология растений*, 2007, т. 54, № 3, с. 373-380. [Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Smith S.O., Shugaev A.G. Influence of water deficit on respiration of conducting bundles of the leaf petioles of sugar beet. *Plant physiology*, 2007, vol. 54, no. 3, pp. 373-380. (In Russ.)]

12. Zhigacheva I.V., Burlakova E.B. Adaptogen decrease the generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Research progress in chemical and biochemical physics. Pure and applied science*, New-York: Nova publishers, 2014, pp. 193-2055

13. 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. Effect of electron transport inhibitors on the formation of reactive oxygen species in the oxidation of succinate by mitochondria of pea. *Biochemistry*, 2003, vol. 68, no. 7, pp. 910-916. (In Russ.)]

14. 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.

15. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of Macroscale Method to the Microscale for Fatty Acid Methyl Trans esterification of Biological Lipid Extracts. *J. Chromatogr.* 1979, vol. 151, pp. 384-398.

16. 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 Chromatographia. *Chromatography*, 1977, vol. 10, pp. 545-546.

17. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Perfused Rat Heart. Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 2004, vol. 94, pp. 53-59.

18. Дёмин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена desA Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией. *Физиология растений*, 2008, т. 55, с. 710-720. [Diomin I.N., Deryabin A.N., Sinkevich M.S., Trunova T.I. The introduction of the desA gene Δ 12-acyl-lipid desaturase of the cyanobacterium increases the resistance of potato plants to oxidative stress induced by hypothermia. *Plant physiology*, 2008, vol. 55, pp. 710-720. (In Russ.)]

19. Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *BBA*, 2014, vol. 1837, no. 4, pp. 427-443.