

РЕСВЕРАТРОЛ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Жигачева И.В.¹, Русина И.Ф.², Васильева С.В.¹, Петрищева М.С.¹

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

г. Москва, РФ; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

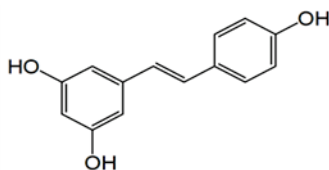
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: rusina939@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.06.2020

Аннотация. Изучена антиоксидантная и антирадикальная активность природного флавоноидного полифенола – ресвератрола (РВ) в сравнении с антирадикальной и антиоксидантной активностью известных антиоксидантов. Препарат обладает довольно высокими скоростями взаимодействия с пероксильными радикалами. Показано, что при низких концентрациях $[РВ] \leq 10^{-5} М$ ресвератрол проявлял свойства сильного ингибитора свободно-радикального окисления. В концентрациях $[РВ] \geq 10^{-5} М$ активировал свободно-радикальное окисление. Исследование антиоксидантной активности РВ на модели «старения» митохондрий показало наличие у препарата высокой антиоксидантной активности. РВ предотвращал активацию ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс при более низких концентрациях, чем известные антиоксиданты ионол (дифунол) и мексидол. Высокая антирадикальная и антиоксидантная активность ресвератрола, вероятно, могла обеспечивать наличие у препарата антистрессовых свойств. Исследование проявления антистрессовых свойств проводили на молекулярно - генетической модели *E.coli*. Испытание различных доз и композиций РВ с такими биологически активными соединениями как донор NO – ТНКЖ-тио, тиомочевина (ТМ) и мексидол показало, что совместная комплексная обработка клеток *E.coli* РВ /ТМ и донором NO – ТНКЖ-тио почти в 4–6 раз усиливала экспрессию генов *SOS* - и *SoxRS* - ДНК- репарационных систем защиты. Исследование адаптогенных свойств препарата на моделях острого алкогольного отравления (ОАО) и острой гипобарической гипоксии (ОГГ) для крыс, а также дефицита воды (ДВ) для проростков гороха подтвердило наличие у препарата РВ этих свойств. Введение животным $10^{-9} М$ РВ за 45 минут до ОАО или ОГГ предотвращало активацию ПОЛ. Кроме того, обработка семян гороха $3 \times 10^{-5} М$ РВ предупреждала активацию ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды. На основании полученных данных можно предположить, что адаптогенные свойства ресвератрола, вероятно, обусловлены его антиоксидантной и антирадикальной активностью.

Ключевые слова: ресвератрол, антиоксиданты, стресс, ПОЛ, экспрессия генов, митохондрии, *E. coli*.

Активные формы кислорода (АФК) рассматривают как сигнальные молекулы, играющие существенную роль в процессах дифференцировки, пролиферации, апоптоза, старения и ответах клетки на стрессовые воздействия [1]. Приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате неполного восстановления образует активные формы кислорода (АФК) [2], которые вместе с пероксинитритами участвуют в клеточной редокс сигнализации. В норме стационарный уровень АФК в органах и тканях весьма низок (10^{-10} - 10^{-11} М) за счет наличия в них ферментативной и не ферментативной систем регуляции накопления и утилизации АФК [3]. Смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации АФК митохондриями сопровождается изменением функционального состояния этих органелл. При этом наблюдается снижение мембранного потенциала ($\Delta\psi$), скоростей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий и эффективности окислительного фосфорилирования. Эти изменения нередко обусловлены окислительным повреждением mtДНК, tРНК, белков и липидов мембран митохондрий [4]. 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 флавоноидный полифенол – ресвератрол (транс-3,4,5-тригидроксистильбен).



Ресвератрол

Ресвератрол образован двумя фенольными кольцами, связанными между собой двойной стирольной связью, что позволяет существовать ему в виде цис- транс- изомеров. Отметим, что транс-ресвератрол (РВ) является более эффективным биологически активным соединением [5]. По своей структуре он сходен с

диэтилстильбэстролом, благодаря чему РВ может связываться с рецепторами эстрогена, активируя транскрипцию эстрогензависимых генов [6]. Тем не менее, одним из основных свойств РВ являются его антиоксидантные свойства. Изучение реакции перекисных радикалов липидов LOO^* , с транс-ресвератролом с помощью импульсного радиолитического анализа показало более высокую эффективность пара-гидроксильной группы транс-ресвератрола при взаимодействии с радикалами, чем у его мета-гидроксильных групп [7].

Антиоксидантные свойства у транс-ресвератрола были выявлены Dani C с соавторами на клетках *Saccharomyces cerevisiae* [8]. Они показали, что РВ почти в 3 раза снижал образование АФК клетками *Saccharomyces cerevisiae*, обработанных перекисью водорода. Это позволило авторам предположить, что ресвератрол может устранять гидроксильные радикалы, образующиеся в результате реакции Фентона. Кроме того, было показано, что РВ ингибирует свободно-радикальное окисление в головном, спинном мозге, печени и эритроцитах [5,9,10]. Его антиоксидантные свойства обусловлены не только ингибированием свободно-радикального окисления, но и повышением активности ферментов антиоксидантной системы. РВ в низких микромолярных концентрациях повышает активность Mn-СОД, каталазы, NADPH-хинон-оксидоредуктазы и глутатион-S-трансферазы, γ -глутамилцистеинсинтетазы [11]. Увеличение активности ряда этих ферментов осуществляется за счет активации редокс-чувствительных факторов транскрипции NF- κ B/ARE [12].

Однако, в зависимости от концентрации РВ и типа клеток, препарат может проявлять прооксидантные свойства, что приводит к окислительному повреждению клеточной ДНК в присутствии ионов переходных металлов, таких как медь [5]. Кроме того, ресвератрол может индуцировать дозозависимую клеточную индукцию как анти-, так и проапоптотических механизмов. В раковых клетках ресвератрол, по-видимому, вызывает запрограммированную гибель клеток, активируя рецепторы смерти и митохондриальные пути апоптоза, индуцируя остановку клеточного цикла и / или повышая чувствительность клеток к апоптозу, вызванному лекарственными препаратами [13,14]. Эти свойства РВ находят применение в клинике в качестве химиотерапевтического агента [15,16]. Напротив, существуют также исследования, показывающие, что в определенных злокачественных клетках и других нераковых типах клеток ресвератрол может ингибировать активацию каспазы и ослаблять гибель апоптотических клеток [16].

Отметим, что ресвератрол способен предупреждать нарушения биоэнергетических функций митохондрий, воздействуя на них прямо или косвенно. С другой стороны, ресвератрол может вызывать дисфункцию митохондрий и/или, как уже отмечалось, запускать апоптоз. Точный механизм, с помощью которого ресвератрол модулирует функцию и динамику митохондрий, еще неизвестен, но РВ может активировать или подавлять экспрессию генов, влияющих на функциональное состояние этих органелл.

В связи с этим целью исследования было изучение влияния ресвератрола и стрессовых воздействий на функциональное состояние митохондрий

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на крысах линии Wistar, весом 150-170 г. Поскольку препарат обладает низкой биодоступностью, антистрессовые свойства ресвератрола частично исследовали на 5-дневных этиолированных проростках гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора 2, которые обрабатывали водными растворами препарата.

Регулирующие стандарты.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [17], согласно утвержденному письменному протоколу и в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [18].

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 3×10^{-5} М водном растворе ресвератрола (РВ). Затем все семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. После этого половину проростков контрольной группы (ДВ) и проростки, обработанные РВ, 2 суток выдерживали на сухой фильтровальной бумаге. Спустя 2 суток все проростки перемещали 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.

В качестве молекулярно - генетических моделей индукции ДНК- репарационных систем защиты клетки от окислительных стрессов *soxS*- и *soxRS*[2Fe-2S]- использовали штаммы *E. coli* TN 530 (F2Δ(*lacZYA-argF*)U169 rpsL λ (*soxS*⁻-*lacZ*) *soxRS*⁺) [*soxS*::*lacZ*] [19] и *E. coli* PQ 37 (*sfiA*::Mu d(AP *lac*)cts *lac* ΔU169mal+uvrA galE galY Phoc rfa F- thr leu his pyrD thi trp ::Muc⁺ srl 300::Tn10) [18] с делециями в хромосоме генов *lac*- оперона. Штаммы получены от д-ра Нуношиба, Япония (Т. Nunoshiba) и Мориса Хофнунга (Maurice Hofnung), Институт Пастера, Париж, соотв. В слитых промоторах обоих штаммов изучаемый структурный ген *soxS*/*sfiA* перенесен в конструкцию с промотором гена *lacZ* [*soxS*::*lacZ*], либо [*sfiA*::*lacZ*], так что экспрессия тестируемых генов регистрируется опосредованно: по активности фермента β - галактозидазы в колориметрическом тесте.

Экспрессия генов *soxS* и *sfiA* *E. Coli*.

Эксперименты проведены в соответствии с протоколом Миллера (1972) с использованием 0-нитрофенил- β -Д- галактопиранозиды – хромогена для β -галактозидазы. Активность этого фермента измеряли на

спектрофотометре PD-303UV (Apel Co. Ltd, Япония) при $\lambda = 420$ нм. Количество единиц β -галактозидазы рассчитывали по уравнению:

$E = 1000 \times D_{420} / t$, где: D - показатель поглощения при 420 нм, а t - время инкубации с хромогеном, и относили к оптической плотности культуры при $\lambda = 600$ нм (OD_{600}) [19,20]. Позитивный контроль в экспрессии гена *soxS* – 0,5 мМ менадион, а *sfiA* – 2,63 нМ 4-нитрохинолин-оксид. В ряде опытов использован хелатор железа 0,5 мМ о-фенантролин (ОФ). Результаты представлены как среднее из трех измерений.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [21]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g, 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения: 0,25 М сахароза, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования [22]. 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 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.

Антирадикальную активность (АРА) препарата оценивали хемилюминисцентным методом (ХЛ) по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (RH), которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила АИБИН (60°). Интенсивность ХЛ усиливали 9,10-дибромантраценом (ДБА). Измерения интенсивности ХЛ проводили на хемилюминиметре с фотоумножителем «H7467» фирмы «Hamamatsu» в качестве регистратора света в видимой части спектра (310-650 нм). Эффективную константу k_{inh} рассчитывали из серии ХЛ кривых с разной концентрацией ресвератрола (РВ). Полученные результаты соотносили с данными, полученными с использованием антиоксидантов дибунола, хромана и мексидола.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [23]. 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 десяти миллиметровых кварцевых кюветках на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Острая гипобарическая гипоксия. В барокамере создавали разрежение, соответствующее высоте 9,0 тысяч метров над уровнем моря (230,40 мм рт. ст.), «Подъем» проводили в первую минут до 5 тыс. м. (давление 405 мм рт. ст.), а в каждую последующую еще на одну тысячу метров. Время нахождения крыс «на высоте» 9,0 тысяч метров над уровнем моря – 5,0 минут.

Модель острого алкогольного отравления. Крысам орально вводили этанол в дозе 7,5 г/кг

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

В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ (Merck, Германия), сахароза, Трис, (Sigma, Aldrich), БСА (свободный от жирных кислот) (Sigma, Aldrich), HEPES (MP Biomedicals, Германия), дитиотреитол (AppliChem), Hepes (4- (2-Гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота) (Biochemica Ultra, для молекулярной биологии) (MB Biomedicals, Германия), нитрохинолин-1-оксид, менадион, этилбензол («Sigma», Aldrich), (5-галактозидаза (Boehringer Mannheim, Германи), 0-нитрофенил- β -Д-галактопиранозид (ONPG, Calbiochem, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования антирадикальной активности РВ использовали хемилюминесцентный (ХЛ) метод. Скорость инициирования свободно-радикального окисления W_i определяли и контролировали непосредственно в реакционной смеси до и после опыта по кинетике тушения хемилюминесценции стандартным ингибитором-хроманом CrC1 (синтетическим аналогом токоферола) по формуле [24]:

$$W_i = f [InH_0] / \tau_{0,5} = 2 [CrC_1]_0 / \tau_{0,5} \quad (1),$$

где $[InH]_0$ – концентрация ингибитора; f – стехиометрический коэффициент ингибирования; $\tau_{0,5}$ – период торможения в секундах от момента введения образца до выхода интенсивности свечения по мере расходования ингибитора на уровень $I_{0,5}$ (рис. 1).

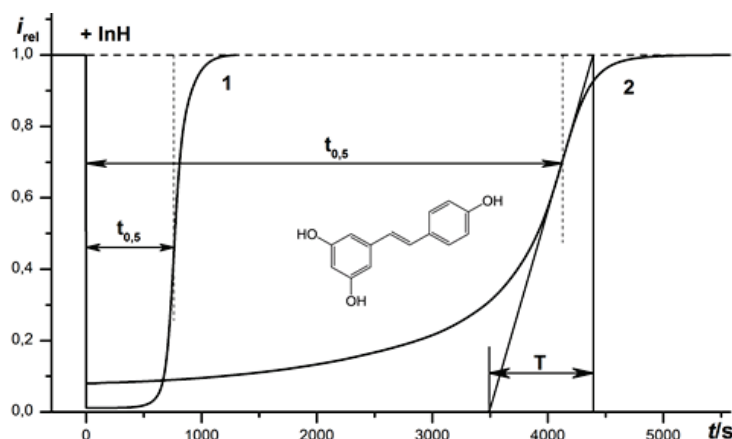


Рисунок 1. Кинетическая кривая тушения хемилюминесценции в процессе окисления этилбензола (20% в хлорбензоле) при добавлении: **1** – хроман $[InH_0]=4.00 \cdot 10^{-6}M$; **2** – ресвератрол $[InH_0]=1.65 \cdot 10^{-5}M$; $W_i = 9.2 \cdot 10^{-9}(Mc^{-1})$; $T=50^{\circ}C$

По мере расходования антиоксиданта хемилюминесценция постепенно восстанавливается по S-образной кривой, тангенс угла наклона которой в точке перегиба описывается уравнением [24]:

$$(k_{inh})_{tg\varphi} = \frac{\sqrt{2k_t} \cdot tg\varphi}{\sqrt{W_i} \cdot 0,273} = \frac{\sqrt{2k_t}}{\sqrt{W_i} \cdot 0,273 \cdot T_{sec}} \tag{2}$$

где k_t – константа скорости рекомбинации пероксидных радикалов; $tg\varphi$ – максимальный наклон кинетической кривой восстановления свечения ХЛ в точке перегиба. Константу (k_{inh}) рассчитывали по формуле (2).

При глубоком тушении ХЛ, можно получить упрощенную формулу для расчета стехиометрии ингибирования:

$$f = W_i \times \tau_{0,5} / [InH]_0 \tag{3}$$

На рисунке 2 представлена серия кинетических кривых тушения хемилюминесценции инициированного окисления этилбензола добавками РВ.

Расчитанные значения параметров антирадикальной активности ресвератрола k_{inh} и f по кинетическим кривым ХЛ (рис. 2) составляют: $k_{inh}=(2,36 \pm 0,4) \times 10^5(Mc)^{-1}$; $f=(2,1 \pm 0,2)$. (Расчет по 8 опытам).

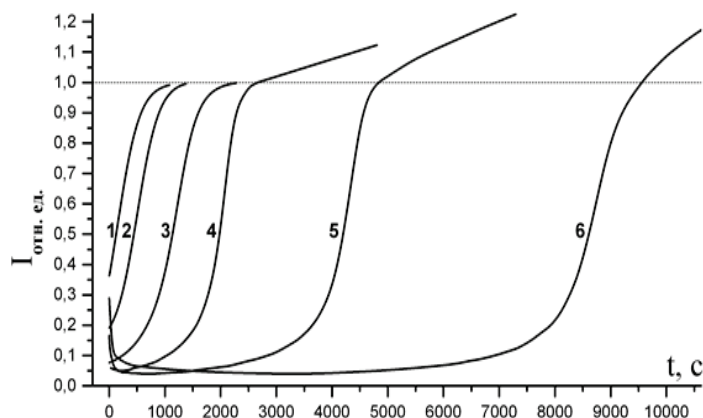


Рисунок 2. Серия кинетических кривых тушения хемилюминесценции инициированного окисления этилбензола различными концентрациями РВ (RH=20%; $W_i=0,92 \times 10^{-9}(Mc)^{-1}$; $[ДБА]=5 \times 10^{-3}M$; $T=50^{\circ}C$)

Номер кривой ХЛ					
1	2	3	4	5	6
[концентрация ресвератрола] $\times 10^6$					
1 \times	2 \times	4 \times	12 \times	23 \times	40 \times
0,85	1,67	3,23	10,0	19,6	32,3

Таблица 1. Сравнительная антирадикальная активность ингибиторов $W_i=5,0 \times 10^{-8} (\text{Mc})^{-1}$; (RH)-этилбензол(20%); [ДБА]= $5 \times 10^{-3} \text{M}$; 50°C

Антиоксидант	$k_{\text{InH}} \times 10^{-4}$ (Mc) ⁻¹	f	Ссылка литер.
ресвератрол	23,6±4,0	2,1±0,2	—
дибунол	2,0 – 2,2	1,9	[24,25,26]
Пирокатехин(о-иоксibenзол)	60,0	2,0	[27]
мексидол	4,7	1,9	[24]
Хроман CrC ₁	452	2,0	[24,26]

Кинетические кривые (рис. 2) свидетельствуют о том, что при использовании малых концентраций ресвератрола $[\text{PB}] \leq 10^{-6} \text{M}$ после расходования антиоксиданта интенсивность ХЛ возвращается на первоначальный уровень. Превышение $[\text{PB}] \geq 10^{-6} \text{M}$ приводит к росту интенсивности ХЛ (~20%) после выхода из периода индукции. Скорость инициирования, измеренная с помощью ингибитора хромана, также превышает на 10-20% первоначальное значение. Этот факт, вероятно, связан с процессами прооксидации при больших дозах ресвератрола, которые ранее не учитывались в схеме окисления. Для интерпретации экспериментальных данных следует расширить кинетическую схему процесса ингибирования при большой дозе препарата РВ и дополнительно ввести реакцию продолжения цепи окисления с участием ингибиторного радикала:



В следующей серии экспериментов исследования антиоксидантной активности ресвератрола проводили на митохондриях печени крыс, используя модель «старения» митохондрий (20-25 мин. инкубация митохондрий в гипотонической солевой среде при комнатной температуре). «Старение» приводило к активации ПОЛ, интенсивность которого регистрировали по флуоресценции конечных продуктов ПОЛ – оснований Шиффа. В результате инкубации митохондрий в гипотонической солевой среде интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 1, 6 раза. Введение РВ в среду инкубации митохондрий вызывало снижение интенсивности ПОЛ. Наиболее эффективными концентрациями были 10^{-5} - 10^{-14}M (рис. 3). В концентрациях выше 10^{-5}M ресвератрол проявлял прооксидантные свойства.

Таким образом, исследуемый препарат проявляет антиоксидантные свойства в довольно широком интервале концентраций. По данным литературы ионол и мексидол эффективно ингибируют ПОЛ в более высоких концентрациях и более узком интервале концентраций [28, 29].

Обладая высокими антирадикальными и антиоксидантными свойствами РВ, возможно, будет проявлять и антистрессовые свойства. Проверку на наличие этих свойств в начале провели на молекулярно- генетических моделях ДНК- репарационных процессов бактериальной клетки *E.coli*. Эти механизмы в основном универсальны и свойственны всем биосистемам. Использование клеток *E.coli* позволяет показать на ДНК- репарационных системах *SoxRS* и *SOS* - регулонов, как динамическая модуляция генной экспрессии изменяет устойчивость к метаболическим оксидантам и экзогенному окислительному стрессу [30]. Моно обработка клеток *E. coli* такими препаратами как тиомочевинна (ТМ) и ресвератрол в концентрации 10^{-5} - $5 \times 10^{-4} \text{M}$ не влияла на экспрессию тестируемых генов (рис 4,5). При этом необходимо было выяснить, каким образом будет проявляться сигнальная активность генов *sfIA* *SOS*-регулона и *soxS* *SoxRS*-регулона при совместной обработке клеток *E. coli*

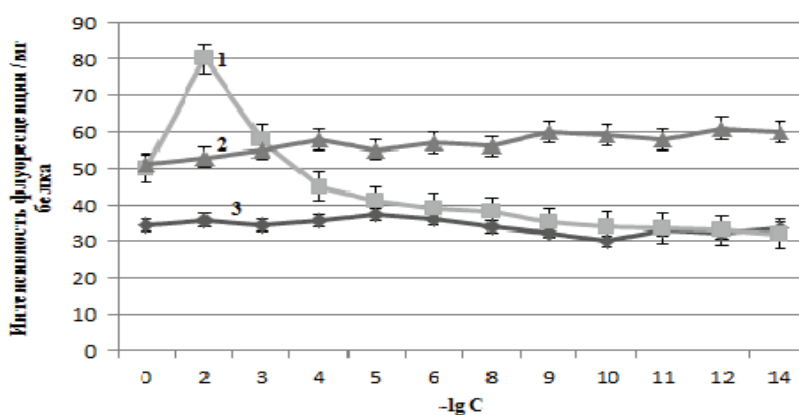


Рисунок 3. Влияние «старения» митохондрий и различных концентраций ресвератрола (РВ) на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (Основания Шиффа). Ось X – ($-\lg$) концентрации ресвератрола; по оси Y- интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в условных единицах/мг белка; 1- «старение» митохондрий + РВ; 2 - «старение» митохондрий; 3 – контроль (без введения в среду инкубации митохондрий ресвератрола)

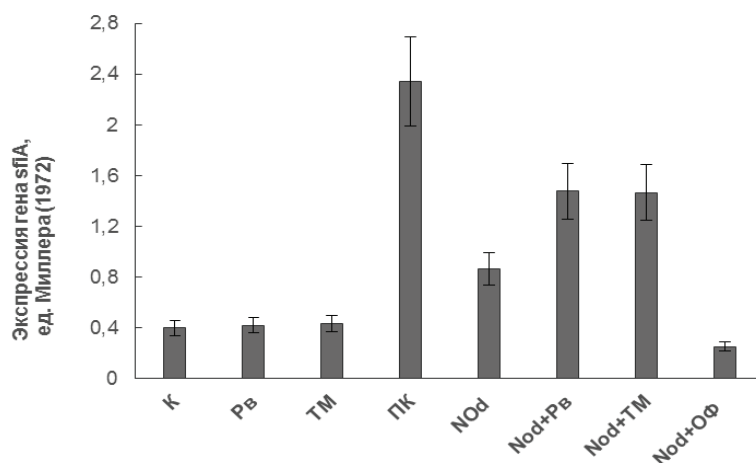


Рисунок 4. Сигнальная активность гена *sfIA* *E.coli* PQ37[*sfIA::lacZ*] *SOS*-регулона, индуцированная моно обработкой клеток Pв, тиомочевинной (ТМ) и донором NO - ТНКЖ-тио (NOd) (0,05 мМ) либо в сочетании Pв с ТНКЖ-тио; тиомочевинны (ТМ) с ТНКЖ-тио. Хелатор железа (ОФ)- 0,05 мМ. Все препараты для обработки использовали в концентрации 5×10^{-5} М. Позитивный контроль (ПК)-4-нитрохинолиноксид, 2,63 нМ.

ресвератролом и донором NO - ТНКЖ-тио, поскольку известно, что Pв обладает способностью увеличивать синтез оксида азота *in vivo* и является индуктором фермента NO-синтазы [31]. Кроме того, эффекты Pв/ТНКЖ-тио сопоставляли с эффектами ТМ/ТНКЖ-тио т.к. тиомочевина обладает довольно высокими антирадикальными свойствами [32].

При комплексной обработке обоих штаммов Pв или тиомочевинной (1×10^{-5} - 5×10^{-4} М) и донором NO (5×10^{-5} М) зарегистрирован значительный рост экспрессии обоих изучаемых генов, уровень которого коррелировал с ростом дозы Pв или ТМ. Во всех вариантах показатели экспрессии гена - регулятора *soxS* были многократно выше, в сравнении с уровнем экспрессии гена *sfIA* *SOS*-регулона.

Максимальные - и практически равные уровни экспрессии генов относительно контроля - в экспериментах обеих серий зарегистрированы при обработке клеток комплексом ресвератрола с ТНКЖ-тио и тиомочевинны с ТНКЖ-тио, что может указывать на сходство механизмов их антиоксидантного действия в изученных системах. Нулевая сигнальная активность NO донора при внесении в клетки о-фенантролина (ОФ) прямо доказывает, что эта активность облигатно зависит от формирования в клетках сигнальных молекул динитрозильного комплекса железа из донируемого NO и клеточного железа (Fe^{2+}). Хелатирование этого железа внесенным ОФ исключает образование указанных сигнальных молекул и полностью ингибирует сигнальный генетический процесс с участием оксида азота. Полученные данные могут свидетельствовать о возможной активации Pв в сочетании с эндогенными антиоксидантами экспрессии генов *sfIA* *SOS*-регулона и *soxS* *SoxRS*-регулона в условиях стресса, что свидетельствует о протекторных свойствах исследуемого препарата.

Наличие антистрессовых свойств у Pв исследовали также на моделях острого алкогольного отравления (ОАО) и острой гипобарической гипоксии (ОГГ) для крыс, а также дефицита воды (ДВ) для проростков гороха.

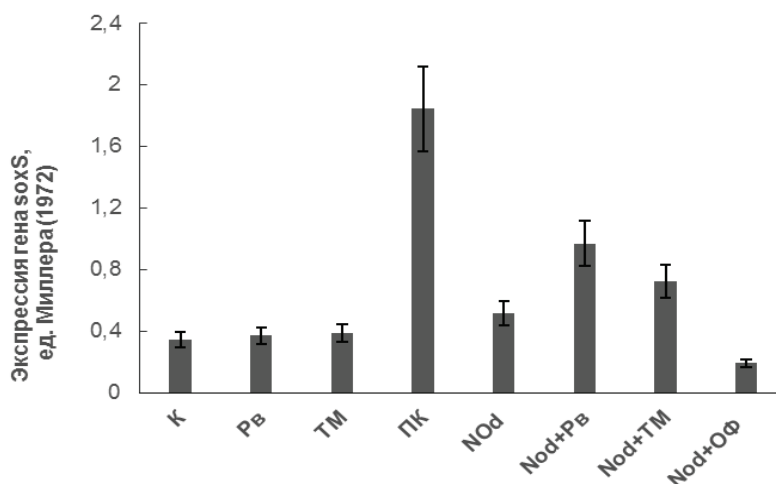


Рисунок 5. Сигнальная активность гена *soxS* *E.coli* TN530[*soxS::lacZ*] *SoxRS*-регулона, индуцированная моно обработкой клеток Pв, тиомочевинной (ТМ) и донором NO - ТНКЖ-тио (NOd) (0,05 мМ) либо в сочетании Pв с ТНКЖ-тио; тиомочевинны (ТМ) с ТНКЖ-тио. Хелатор железа (ОФ)- 0,05 мМ. Все препараты для обработки использовали в концентрации 5×10^{-5} М. Позитивный контроль - менадион, 0,5 мМ.

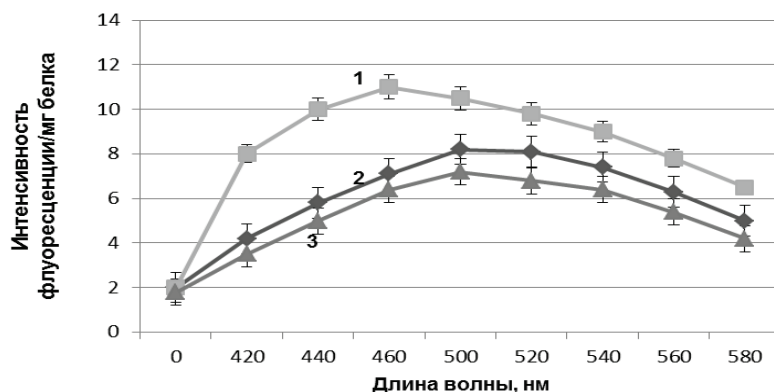


Рисунок 6. Влияние острого алкогольного отравления (ОАО) и ресвератрола (РВ) на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. Ось X – длина волны в нм; по оси Y – интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в условных единицах/мг белка. 1 – ОАО; 2 – введение 10^{-9} М РВ за 45 минут до воздействия + ОАО; 3 – контроль

Острое алкогольное отравление приводило к активации ПОЛ в мембранах митохондрий печени. При этом интенсивность флуоресценции конечных продуктов перекисного окисления липидов возрастало в 1,5 раза. Введение животным 10^{-9} М РВ за 45 минут до воздействия предотвращало активацию ПОЛ: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти не отличалась от контрольных величин (рис. 6).

Отметим, что введение ресвератрола (10^{-9} М) животным за 45 минут до острой гипобарической гипоксии также предотвращало активацию ПОЛ.

Подтверждением предположения об антистрессовых свойствах препарата является влияние РВ на активацию ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этилированных проростков гороха в условиях дефицита воды. Дефицит воды активировал ПОЛ в мембранах митохондрий проростков, что отразилось на интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов. При этом интенсивность флуоресценции возрастала в 2 раза (рис. 7). Обработка семян гороха 3×10^{-5} М препарата предупреждала активацию ПОЛ.

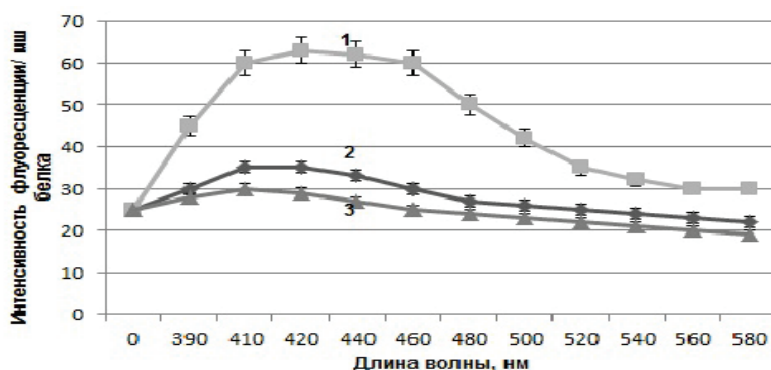


Рисунок 7. Спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (основания Шиффа) в мембранах митохондрий проростков гороха, обработанных РВ в условиях дефицита воды (ДВ)

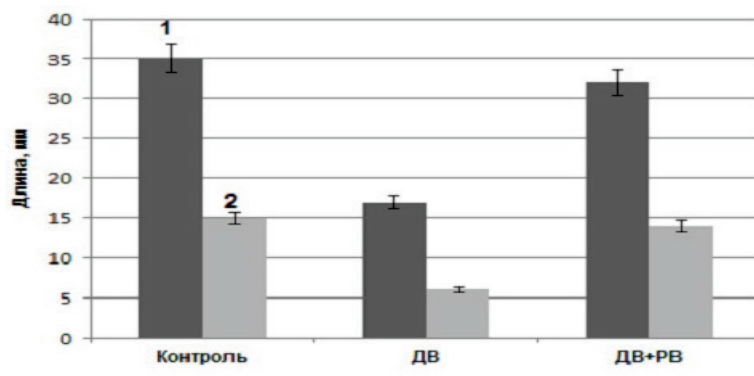


Рисунок 8. Влияние дефицита воды (ДВ) и обработки семян гороха РВ на длину побегов и корней 5-дневных проростков. 1 – корни; 2 – побеги

Более того, препарат, предотвращая активацию ПОЛ в мембранах митохондрий, оказывал влияние на физиологические показатели, а именно: на рост проростков гороха в условиях дефицита воды. Известно, что проростки гороха особенно чувствительны к дефициту воды. Было показано, что на ранних стадиях роста проростки более чувствительны к дефициту воды, чем в последующие периоды. В наших экспериментах мы использовали наиболее чувствительные к данному стрессу 1-дневные проростки. Дефицит воды тормозил процессы роста (рис. 8), что согласуется с данными литературы [34]. Обработка семян гороха 3×10^{-5} М препарата предотвращала торможение ростовых процессов у проростков в этих условиях (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ресвератрол, обладая высокими значениями антирадикальной и антиоксидантной активности, проявляет антистрессовые свойства. Предотвращая окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов мембран митохондрий, препарат способствует сохранению функционального состояния митохондрий и предотвращает нарушения энергетического метаболизма клетки при действии на организм стрессовых факторов. Кроме того, совместная с эндогенными антиоксидантами активация ресвератролом экспрессии генов *sfiA* SOS-регулона и *soxS SoxRS*-регулона в условиях стресса, вероятно, обеспечивает защиту клеточной ДНК от окислительного повреждения. И, наконец, увеличение содержания NO в клетке, которое наблюдается при действии стрессовых факторов на растения [35], при обработке РВ будет способствовать защите клеток растений от окислительного повреждения. На основании полученных данных можно предположить, что РВ является не только адаптогеном, но и регулятором роста растений.

Список литературы / References:

1. Скулачев В.П. Новые сведения о биохимическом механизме запрограммированного старения организма и антиоксидантной защиты митохондрий. *Биохимия*, 2009, т. 74 (12), с. 1718-1721. [Skulachev V.P. New information about the biochemical mechanism of programmed aging of the body and antioxidant protection of mitochondria. *Biokhimiya*, 2009, vol. 74 (12), pp. 1718-1721. (In Russ.)]
2. Brand M.D., Affourt C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.*, 2004, vol. 37, pp. 755-767.
3. 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, pp. 1122-1133.
4. Gladden J.D., Ahmed M.I., Litovsky S.H., et al. Oxidative stress and myocardial remodeling in chronic mitral regurgitation. *Am. J. Med. Sci.*, 2011, vol. 342, pp. 114-119.
5. Pandey K.B., Rizvi S.I. Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *King Saud University Arabian Journal of Chemistry*, 2011, vol.4, pp. 293-298.
6. Кароматов И.Д., Шодиева М.С. Биологически активное вещество растительного происхождения ресвератрол-лечебные свойства. *Биология и интегративная медицина*, 2018, № 3, с. 178-198. [Karomatov I.D., Shodieva M.S. Biologically active substance of plant origin resveratrol-medicinal properties. *Biologiya i integrativnaya meditsina*, 2018, no. 3, pp. 178-198. (In Russ.)]
7. Stojanović S, Sprinz H., Brede O. Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of trans-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 391 (1), pp. 79-89.
8. Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira M.D., Henriques J.A., et al. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2008, vol. 56, pp. 4268-4272.
9. Sun, A.Y.; Wang, Q.; Simonyi, A.; Sun, G.Y. Botanical phenolics and brain health. *Neuromol. Med.*, 2008, vol. 10, pp. 259-274.
10. Gedik E., Girgin S, Ozturk H. et al. *World J.* Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *Gastroenterol.*, 2008, vol. 14 (46), pp. 7101-1706.
11. Carrizzo A., Forte M., Damato A. et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, vol. 61, pp. 215-226.
12. Amie J. Dirks Naylor. Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle. *Life Sciences*, 2009, vol. 84, pp. 637-640.
13. Ungvari Z., Orosz Z., Rivera A. et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *AJP Heart and Circulatory Physiology*, 2007, vol. 292(5), pp. H2417-2424.
14. de Oliveira M.R., Nabavi S.F, Manayi A. et al. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, vol. 1860, pp. 727-745.
15. de la Lastra C A , Villegas I. Resveratrol as an Antioxidant and Pro-Oxidant Agent: Mechanisms and Clinical Implications. *Biochem Soc Trans*, 2007, vol. 35 (5), pp. 1156-1160.
16. Athar M., Back J.Ho, Kopelovich L. Multiple Molecular Targets of Resveratrol: Anti-carcinogenic Mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 2009, vol. 486 (2), pp. 95-102.
17. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)*, Strasburg, 1986.

18. Каркищенко Н.Н., Грачевой С.В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. М: Профиль, 2010, 358 с. [Karkishchenko N.N., Grachevov S.V. *Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research*. М: Profil', 2010, 358 p. (In Russ.)]
19. Nunoshiba T., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1993, vol. 90 (21), pp. 9993-9997.
20. Quillardet P., Huisman O., D'ari R., Hofnung M. The SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1982, vol. 79 (19), pp. 5971-5975.
21. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, vol. 501(3), pp. 415-423.
22. 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. The effect of electron transport inhibitors on the formation of reactive oxygen species during the oxidation of succinate with pea mitochondria. *Biokhimiya*, 2003, vol. 68 (7), pp. 910-916, DOI: 10.1023/A:1025078815819. (In Russ.)]
23. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems and Tissues. *Ann Biochem*, 1973, vol. 52 (1), pp. 1-9, DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8,
24. Русина И.Ф., Карпучин О.Н., Касаикина О.Т. Хемилюминисцентные методы в исследовании ингибированного окисления. *Химическая физика*, 2013, т. 32 (8), 49-65. [Rusina I.F., Karpukhin O.N., Kasaikina O.T. Chemiluminescent methods in the study of inhibited oxidation. *Khimicheskaya fizika*, 2013, vol. 32 (8), pp. 49-65, DOI: 10.7868/S0207401X13080098. (In Russ.)]
25. Эмануэль Н.М., Гал Д. *Окисление этилбензола (модельная реакция)*. М.: Наука, 1984, 376 с. [Emanuel N.M., Gal D. Oxidation of ethylbenzene (model reaction). М.: Nauka, 1984, 376 p. (In Russ.)]
26. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. Кинетика окси хемилюминисценции и ее исследование для анализа антиоксидантов. *Кинетика и катализ*, 2004, т. 45 (3), с. 355-362. [Belyakov V.A., Vasiliev R.F., Fedorova G.F. Kinetics of oxy chemiluminescence and its study for the analysis of antioxidants. *Kinetika i kataliz*, 2004, vol. 45 (3), pp. 355-362. (In Russ.)]
27. Azatyan N.A., Karpuchina G.V., Belostockaya I.C., Komissarova N.L. The mechanism of inhibition of the oxidation of dihydric. *Petrochemicals*, 1973, no. 3, pp. 435-440.
28. Крайник В.В., Журавлева Л.А., Ушкалова В.Н. Моделирование процессов окисления липидов биомембран. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*, 2008, № 5, с. 31-38. [Kraynik V.V., Zhuravleva L.A., Ushkalova V.N. Modeling of lipid oxidation processes of biomembranes. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*, 2008, no. 5, pp. 31-38. (In Russ.)]
29. Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Васильева О.В. и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина, проксипина. *Вопросы медицинской химии*, 2001, т. 47 (3), с. 288-300. [Klebanov G.I., Lyubitsky O.B., Vasilieva O.V. et al. Antioxidant properties of derivatives of 3-hydroxypyridine: mexidol, emoxypine, proxypine. *Voprosy meditsinskoj khimii*, 2001, vol. 47 (3), pp. 288-300. (In Russ.)]
30. Vasilieva S.V., Lobysheva I. I., Stupakova M.V. et al. Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 454, pp. 177-180.
31. Takahashi S, Nakashima Y. Resveratrol and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells. *Br. J. Nutr.*, 2011, vol. 104, pp. 1-7.
32. Kelner M.J., Bagnell R., Welch K.J. Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound. Explanation for protective effect against paraquat. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265(3), pp. 1306-1311.
33. Takahashi S, Nakashima Y. Resveratrol and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells. *Br. J. Nutr.*, 2011, vol. 104, pp. 1-7.
34. Koster K.L., Reisdorph N., Ramsau J.L. Changing Desiccation Tolerance of Pea Embryo Protoplasts during Germination. *J. Exp. Bot.*, 2003, vol. 54, pp. 1607-1614.
35. Nabi R. B. S., Tayade R., Hussain A. et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, vol. 161, pp. 120-133.

RESVERATROL INCREASES THE BODY'S RESISTANCE TO STRESSFUL EXPOSURES

Zhigacheva I.V.¹, Rusina I.F.², Vasilyeva S.V.¹, Petrishcheva M.S.¹¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics. Russian Academy of Sciences
st. Kosygin, 4, Moscow, 11933, Russia; e-mail: zhigacheva@mail.ru²N.N. Semenov Institute of Chemical Physics Russian Academy of Sciences
st. Kosygin, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: rusina939@mail.ru

Abstract. The antioxidant and antiradical activity of natural phytoalexin - resveratrol (RV) was studied in comparison with the antiradical and antioxidant activity of known antioxidants. The preparation possessed rather high values of the rate constant of interaction with peroxy radicals. Resveratrol was shown to exhibit the properties of a strong inhibitor of free radical oxidation at low concentrations of $[RV] \leq 10^{-5}M$. In concentrations exceeding $[RV] \geq 10^{-5}M$, the RV exhibited prooxidant properties. A study of the antioxidant activity of RV on the model of mitochondrial "aging" demonstrated the presence of a high antioxidant activity at the drug. RV prevented the activation of LPO in the membranes of rat liver mitochondria at lower concentrations, than the known antioxidants ionol (dibunol) and mexidol. The presence of high antiradical and antioxidant activity in resveratrol probably could indicate the presence of anti-stress properties in the drug. Verification for these properties was carried out using the molecular genetic model of *E. coli*. Testing of various doses and combinations of RV with biologically active compounds such as a NO donor - TNIC-thio, thiourea (TU) and mexidol showed that the combined treatment of *E. coli* cells with RV / TU and a NO donor - TNIC-thio is almost 4-6 times enhanced the expression of the *SOS* and *SoxRS* genes of DNA of repair systems of defense. The study of the adaptogenic properties of the drug on models of acute alcohol poisoning (AAP) and acute hypobaric hypoxia (AHH) for rats, as well as water deficit (WD) for pea seedlings confirmed the presence of these properties. The introduction of $10^{-9}M$ RV to animals 45 minutes before AAP or AHH prevented the activation of LPO. In addition, the treatment of pea seeds $3 \times 10^{-5}M$ RV prevented the activation of LPO in the membranes of pea seedlings mitochondria in conditions of water deficiency. Based on the data obtained, it can be assumed that the adaptogenic properties of resveratrol are probably due to its antioxidant and anti-radical activity.

Key words: resveratrol, antioxidants, chemiluminescence, stress, lipid peroxidation, gene expression, mitochondria, *E. coli*.