

УДК 544.43

НАТРИЙ- μ 2-ДИТИОСУЛЬФАТО-ТЕТРАНИТРОЗИЛДИФЕРРАТА ТЕТРАГИДРАТ ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2022 г. И.В. Жигачева*.,# , Н.И. Крикунова*, И.П. Генерозова**.,## , П.А. Буцанец**, Н.Ю. Герасимов*, О.В. Неврова*, С.В. Васильев**, А.Н. Голощапов*

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E-mail: zhigacheva@mail.ru

**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, 127276, Россия

##E-mail: igenozova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Исследуя антистрессовые свойства донора оксида азота железо-тиосульфатного комплекса натрий- μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрата $\text{Na}_2([\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, изучали влияние различных его концентраций на функциональное состояние изолированных митохондрий проростков гороха. Инкубация митохондрий с 10^{-4} М препарата приводила к резкому уменьшению вязкости свободного липидного бислоя, обусловленному увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот в липидной фракции мембран митохондрий. При этом препарат разобщал процессы окисления и фосфорилирования. Обработка митохондрий 10^{-8} М железо-тиосульфатного комплекса сопровождалась повышенным содержанием ненасыщенных C_{20} жирных кислот, которое возрастало на 25–45%, что, вероятно, обуславливало 15%-е снижение вязкости свободного липидного бислоя. В то же время вязкость в области аннулярных липидов мембран возрастала на 20%, что могло свидетельствовать об изменении активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, препарат влиял на скорости окисления НАД-зависимых субстратов и сукцината и повышал эффективность окислительного фосфорилирования. Эта концентрация препарата была выбрана для исследования способности железо-тиосульфатного комплекса повышать устойчивость проростков гороха к дефициту воды. Железо-тиосульфатный комплекс предотвращал изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий в условиях дефицита воды и обусловленные стрессом изменения биоэнергетических характеристик митохондрий. Полученные данные могут свидетельствовать, что протекторные свойства препарата реализуются на мембранном уровне за счет сохранения/увеличения пула ненасыщенных жирных кислот, способствующих поддержанию текучести мембран.

Ключевые слова: митохондрии, оксид азота, вязкость, свободный липидный бислой, аннулярные липиды, жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0006302922040056, EDN: ISYKJS

Митохондрии занимают ключевые позиции в энергетических, окислительно-восстановительных и обменных процессах в клетке. Тем не менее, в условиях стресса эти органеллы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) [1], которые в зависимости от силы стрессового воздействия могут служить индукторами процессов адаптации, либо вызывать

нарушение метаболизма клетки [2]. При этом митохондрии являются источником и мишенью этих интермедиатов.

Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами (ЖК), такими как арахидоновая, линолевая и линоленовая, входящими в состав липидов мембран митохондрий, возможно, имеет следствием активацию перекисного окисления липидов. При этом, вероятно, происходит нарушение осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. В результате происходит набухание митохондрий. Следствием «перекисного» на-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ЖК – жирные кислоты, ТНКЖ-тио – железо-тиосульфатный комплекс (μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат), БСА – бычий сывороточный альбумин, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот.

бухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране), вероятно, является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза. Можно предположить, что препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут повышать устойчивость организма к действию стрессовых факторов. На эту роль в первую очередь претендуют антиоксиданты, ингибирующие свободнорадикальное окисление. Однако снизить генерацию активных форм кислорода митохондриями можно за счет других механизмов. Так, снижение генерации АФК митохондриями на 80% возможно за счет «мягкого разобщения», т.е. увеличения протонной проводимости, не нарушающей синтез АТФ, но приводящий к снижению редокс-потенциала внутренней мембраны митохондрий на 13–15% [3]. Сокращение генерации АФК может быть достигнуто также за счет повышения концентрации эндогенных жирных кислот, либо за счет работы разобщающих белков митохондрий (например, белки холодового и теплового шока) [4]. Кроме того, вклад в защиту клетки от окислительного стресса вносит также митохондриальный АТФ-зависимый калиевый ($\text{mitoK}_{\text{АТФ}}$) канал. Функционирование $\text{P}_{\text{mitoK}_{\text{АТФ}}}$ тесно связано с K^+/H^+ -обменом. Это позволяет осуществлять «калиевый цикл», который обеспечивает возвращение H^+ в матрикс митохондрий, т.е. снижение мембранного потенциала [5]. Уменьшение генерации АФК митохондриями также может быть достигнуто в результате активации альтернативных путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий, прежде всего при активации альтернативной оксидазы [6].

Таким образом существуют самые разнообразные механизмы защиты клетки и организма от окислительного стресса. Эту функцию могут выполнять биологически активные вещества, влияющие на функциональное состояние митохондрий. Показано, что ряд таких веществ накапливался в органах и тканях растений при стрессовых воздействиях. К ним, например, относится оксид азота [7]. Более того, показано, что обработка растений экзогенными донорами NO повышает их устойчивость к действию стрессовых факторов, в том числе и к дефициту воды [8, 9]. Способность оксида азота осуществлять протекторное действие в условиях абиотического стресса может быть обусловлена его способностью связывать свободные ионы железа в составе нитрозильных комплексов, что, возможно, приводит к ингиби-

рованию реакций свободнорадикального окисления, катализируемых редокс-активными ионами железа [10]. Следовательно, NO может действовать как антиоксидант, хотя возможен и синергизм в действии NO и H_2O_2 [11]. Оксид азота также может запускать экспрессию антиоксидантных генов или активировать антиоксидантные ферменты, например, путем посттрансляционных модификаций [12]. Он стимулирует рост придаточных корней и регулирует синтез абсцизовой кислоты [7]. Однако, в ряде случаев быстрое накопление NO в ответ на стрессовые воздействия вызывает ингибирование антиоксидантных ферментов и последующее повышение уровня перекиси водорода [12]. Кроме того, реакция между генерируемыми митохондриями O_2^{\cdot} и NO влечет за собой образование пероксинитрита (ONOO^-), окисляющего липидный компонент мембран, ДНК и тиоловые группы белков. Это приводит к нарушению ферментативной активности [13]. Адаптогенное или стрессовое действие NO, вероятно, определяется его концентрацией, возрастом растения, и видом стресса (дефицит воды, солевой, температурный стресс или действие тяжелых металлов и т.д.).

Отметим, что для молекулы NO кластеры железо-серных белков [Fe-S] являются наиболее предпочтительными мишенями в клетке. При этом митохондрии растений могут быть как источниками, так и мишенью для оксида азота [14]. Почти все комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий являются мишенью для NO или участвуют в его метаболизме. Показано, что комплекс IV является основным сайтом генерации NO и способствует поддержанию уровня АТФ в условиях дефицита кислорода. В условиях нормоксии восстановление нитрита до NO в клетках растений нарушается при действии ингибиторов альтернативной оксидазы или ингибиторов комплексов III и IV электрон-транспортной цепи митохондрий, что указывает на участие в синтезе NO альтернативной оксидазы, а также III и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий [15, 16].

Поскольку реализация антистрессовых программ требует больших энергетических затрат [17], а митохондрии играют одну из ключевых ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов, в том числе и на дефицит воды, особый интерес представляет изучение влияния доноров оксида азота на биоэнергетические характеристики митохондрий, определяющие устойчивость растений к водному дефициту. В своей работе в качестве донора оксида азота мы использовали

натрий μ 2-дитиосульфат-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (кристаллический ТНКЖ-тио, или железо-тиосульфатный комплекс). Преимущество этого донора NO перед другими донорами оксида азота связано с тем, что при растворении в воде он выделяет монооксид азота при физиологических значениях pH без какой-либо (термической, окислительно-восстановительной или фото) активации, а при его разложении не образуются токсические вещества, что обеспечивает экологическую безопасность [18]. Ранее мы показали [19], что обработка семян гороха ТНКЖ-тио повышала устойчивость проростков гороха к дефициту воды. Интересно было исследовать механизмы защитного действия этого препарата и прежде всего изучить связь функционального состояния митохондрий с протекторным эффектом препарата. В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния различных концентраций ТНКЖ-тио на биоэнергетические характеристики митохондрий этиолированных проростков гороха в опытах *in vitro*, а также исследовать влияние обработки семян гороха раствором препарата в той концентрации, которая оказалась наиболее эффективной в опытах с выделенными митохондриями, на функциональное состояние этих оргanelл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Немчиновский 100.

Натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат. Кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат ($[\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$) был синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка, Московская обл.). Генерация NO и образование мононитрозильного интермедиата и частицы $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$ из ТНКЖ-тио начинается только через 40 мин после растворения комплекса [20].

Проращивание семян гороха. Семена гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Немчиновский 100 промывали мыльной водой и 0.01% KMnO_4 . Затем контрольные семена замачивали в воде, опытные семена – в 10^{-8} М ТНКЖ-тио в течение 1 ч. Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение трех суток. После этого половину проростков контрольной группы (дефицит воды) и проростков, обработанных ТНКЖ-тио (дефицит воды +

+ ТНКЖ-тио), переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через сутки проростки переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих трех суток. Вторая половина проростков контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение семи суток. На седьмые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков гороха.

Выделение митохондрий из семисуточных эпикотилей проростков гороха. Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования [21]. Эпикотили гороха длиной 3–6 см (25 г) гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей: 0.4 М сахарозы, 5 мМ EDTA, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиозеритрита и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), свободного от жирных кислот. Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Второе центрифугирование – в течение 3 мин при 3000 g. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей 0.4 М сахарозы, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1% БСА, и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Скорости дыхания митохондрий этиолированных проростков гороха регистрировали с помощью электрода Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 и 0.1% БСА (26°C). Скорость дыхания выражали в нг-атом O_2 /(мг белка в минуту).

Метилвые эфиры жирных кислот. Метилвые эфиры жирных кислот (МЭЖК) были получены путем кислотного метанолиза липидов мембран митохондрий [22, 23]. МЭЖК экстрагировали гексаном, полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава метилвых эфиров жирных кислот. Определение состава МЭЖК проводили на хроматографе Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м \times 0.32 мм, слой 0.25 мкм; J&W Scientific, США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [24]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали как площади пика соответствующей кислоты к

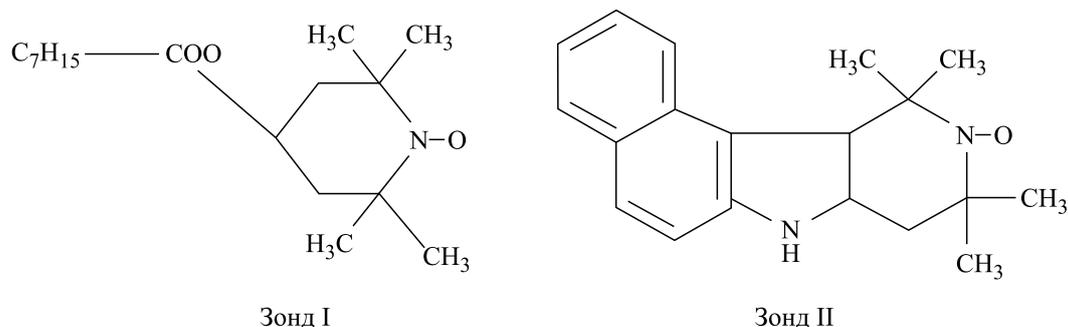


Рис. 1. Структурные формулы зондов.

сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификация метиловых эфиров жирных кислот. Идентификацию МЭЖК в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях аналогичных газохроматографическому анализу, на приборе HewlettPackard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 Да.

Структурные характеристики мембран митохондрий исследовали методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилпиперидин-1-оксил (рис. 1, зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (рис. 1, зонд II), которые различаются по своей локализации в белково-липидных мембранах.

Согласно работе [25] зонд I преимущественно локализуется в свободном липидном бислое мембран на расстоянии 2–4 Å от поверхности, а зонд II локализуется в зоне липидов, связанных с белковыми доменами (аннулярными липидами).

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta n^+ \cdot ((I^+ / I^-)^{0.5} - 1)$, приведенной в работе [26]. Регистрацию спектров ЭПР проводили при температуре 297 К (24°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC (Bruker, Германия).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами оценивали со значимостью $P \leq 0.05$. Обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Реактивы. В работе использовали реактивы следующих фирм: сахароза, Трис, ЭДТА, карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразон, малат, глутамат, сукцинат – Sigma-Aldrich, США; БСА, свободный от жирных кислот – Sigma, США; НЕРЕС – MP Biomedicals, Германия; карбонат калия, метанол, хлороформ – Merck, Германия; гексан – Panreac, Испания; ацетилхлорид – Acros, Бельгия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения протекторных свойств ТНКЖ-тио исследовали влияние инкубации изолированных митохондрий этиолированных проростков гороха с различными концентрациями препарата на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран этих органелл. Обработка митохондрий 10^{-4} М препарата в течение часа приводила к некоторому увеличению содержания ненасыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий. При этом повышалось содержание ЖК, входящих в состав кардиолипина – линолевой и линоленовой на 4 и 40% соответственно, а содержание 20:2ω6 возрастало на 63%. Содержание арахидоновой, эйкозотриеновой и 13- и 11-эйкозеновых кислот резко сокращалось (табл. 1), что отражалось на физико-химических свойствах липидной фракции мембран. Наблюдалось резкое уменьшение микровязкости свободного липидного бислоя, измеренной с помощью зонда I, до значений, при которых мембраны находятся в жидком, но не жидкокристаллическом состоянии (рис. 2а). Значительное разжижение мембран ха-

Таблица 1. Влияние различных концентраций ТНКЖ-тио на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха (отн.%)

ЖК	Контроль	ТНКЖ-тио, 10^{-4} М	ТНКЖ-тио, 10^{-6} М
14:0	$0.67 \pm 0,30$	$0.96 \pm 0,20$	$0.91 \pm 0,22$
16:1 ω 7	$0.90 \pm 0,12$	$1.31 \pm 0,09$	$1.13 \pm 0,11$
16:0	$16,16 \pm 0,5$	$22,00 \pm 1,00$	$15.82 \pm 0,80$
17:0	$2.14 \pm 0,07$	$3.00 \pm 0,10$	$1.37 \pm 0,08$
18:2 ω 6	50.00 ± 0.21	52.00 ± 0.38	43.2 ± 0.51
18:3 ω 3	5.06 ± 0.02	7.07 ± 0.02	4.52 ± 0.02
18:1 ω 9	2.25 ± 0.11	2.25 ± 0.09	2.47 ± 0.08
18:1 ω 7	0.60 ± 0.02	0.6 ± 0.01	1.2 ± 0.01
18:0	3.00 ± 0.21	4.5 ± 0.18	7.4 ± 0.25
20:3 ω 6	2.76 ± 0.11	0.42 ± 0.14	4.00 ± 0.18
20:2 ω 6	4.90 ± 0.23	8.00 ± 0.34	4.26 ± 0.21
20:1 ω 9	6.72 ± 0.61	0.59 ± 0.32	8.40 ± 0.43
20:1 ω 7	3.84 ± 0.18	0.10 ± 0.01	2.82 ± 0.12
20:0	1.00 ± 0.01	0.20 ± 0.01	2.50 ± 0.03

рактрно, например, при развитии патологии у животных [27]. Резкое уменьшение микровязкости липидного бислоя, вероятно, могло привести к нарушению структуры мембран, что в свою очередь могло повлечь за собой дисфункцию митохондрий. В то же время микровязкость приоб-

ковых областей мембран митохондрий возрастала на 10% относительно контроля (рис. 2б). В этом случае, вероятно, структура мембран изменялась так, чтобы сохранить функционирование мембранных белков за счет деструкции липидной фазы.

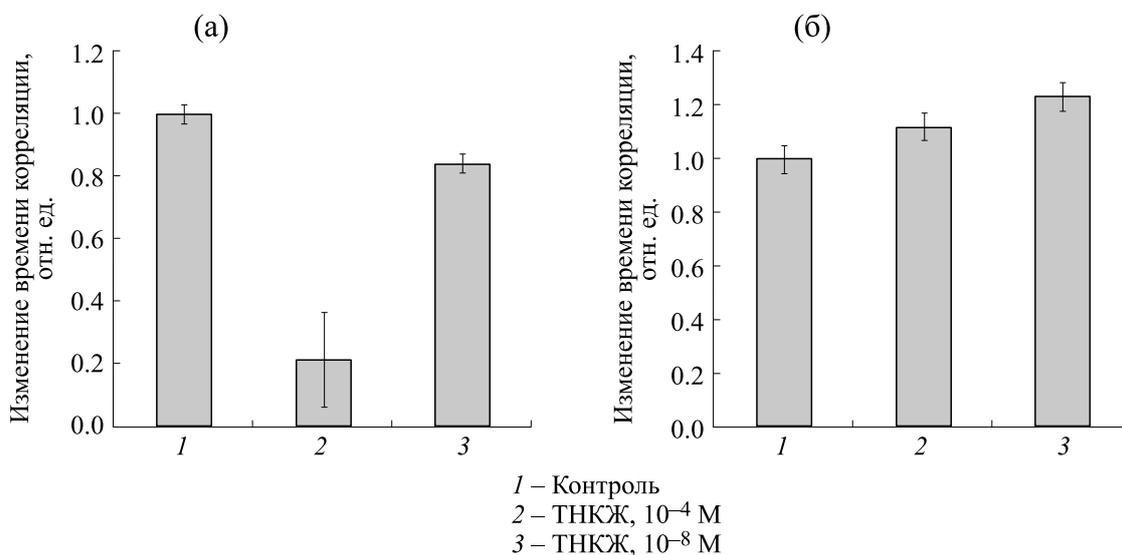


Рис. 2. Относительное изменение времени корреляции вращательной диффузии липидного (а) и белкового (б) зондов при обработке проростков ТНКЖ-тио. Контрольные значения τ_c : для липидного зонда – $0.7 \cdot 10^{-10}$ с, для белкового зонда – $1.25 \cdot 10^{-10}$ с.

Таблица 2. Влияние различных концентраций ТНКЖ-тио на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха

Группа	V_2	Концентрация ТНКЖ-тио, М	ТНКЖ-тио	АДФ	V_4	ДК	ДНФ
Контроль	31.4 ± 2.4	—	—	74.30 ± 5.8	31.4 ± 1.5	3.00 ± 0.02	95.4 ± 4.7
Контроль	28.7 ± 2.0	10^{-4}	53.5 ± 4.0	27.1 ± 3.2	19.4 ± 1.7	1.40 ± 0.01	47.7 ± 3.0
Контроль	21.2 ± 2.1	10^{-5}	27.7 ± 1.8	34.8 ± 3.0	19.6 ± 1.4	1.77 ± 0.02	30.3 ± 2.4
Контроль	24.7 ± 2.2	10^{-6}	28.7 ± 1.4	23.0 ± 1.5	9.2 ± 1.0	2.5 ± 0.03	20.1 ± 2.4
Контроль	21.7 ± 2.8	10^{-8}	20.0 ± 2.2	54.4 ± 3.7	12.6 ± 2.0	4.3 ± 0.03	57.5 ± 4.9

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ НЕРЕС-Tris-буфер (рН 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , 0.1% БСА, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразона. Скорости окисления (представлены в нг атом O_2 /мг белка·мин): V_2 — скорость окисления субстратов, V_4 — скорость окисления в состоянии покоя (скорость окисления субстрата при исчерпании АДФ). Число повторов — 6.

Изменение физико-химических свойств липидного компонента мембран отразилось на активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Исследовали в основном влияние препарата на скорости окисления НАД-зависимых субстратов. Такой выбор был обусловлен тем, что внешние воздействия более сильно влияют на активность комплекса I дыхательной цепи, чем на комплекс II [28–30]. Действительно, введение 10^{-4} М ТНКЖ-тио в среду инкубации митохондрий, содержащей НАД-зависимые субстраты окисления, приводило к разобщению окисления и фосфорилирования. При этом величина дыхательного контроля по Чансу снижалась с 3.00 ± 0.02 до 1.40 ± 0.01 , а соотношение АДФ/О уменьшалось с 2.20 ± 0.02 до 1.15 ± 0.01 (табл. 2).

Иная картина наблюдалась при использовании препарата в концентрации 10^{-6} М. В данном случае происходило снижение содержания ненасыщенных C_{18} -жирных кислот — линолевой и линоленовой, входящих в состав кардиолипина. Их содержание в липидах мембран митохондрий сократилось на 15.6 и 11.0% соответственно. При этом содержание ненасыщенных C_{20} -ЖК даже несколько возрастало. Так, содержание эйкозатриеновой кислоты возрастало на 45%, а эйкозеновой кислоты — на 25% (табл. 1). Изменения в жирнокислотном составе липидов мембран митохондрий отразились и на биоэнергетических характеристиках. В концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М ТНКЖ-тио проявлял небольшой разобщающий эффект, выражающийся в 16%-м и 30%-м увеличении скоростей окисления субстратов (V_2) (табл. 2). При этом в концентрации 10^{-6} М препарат значительно снижал скорости окисления

НАД-зависимых субстратов как в фосфорилирующем состоянии, так и в присутствии разобщителя (табл. 2). Вероятно, это обусловлено снижением содержания в липидном компоненте мембран линолевой и линоленовой кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивающего эффективную работу дыхательной цепи митохондрий [30]. Однако эффективность окислительного фосфорилирования менялась незначительно: дыхательный контроль по Чансу уменьшался с 3.00 ± 0.02 до 2.50 ± 0.03 . Отметим, что введение в среду инкубации митохондрий 10^{-8} М препарата приводило к повышению эффективности окислительного фосфорилирования при окислении НАД-зависимых субстратов. Это увеличение было обусловлено некоторым снижением скоростей транспорта электронов в состоянии покоя (после исчерпания АДФ). ТНКЖ-тио также увеличивал скорости окисления сукцината в присутствии АДФ, в результате чего в полтора раза возрастала величина дыхательного контроля по Чансу, а АДФ/О увеличивалось с 1.40 ± 0.02 до 1.71 ± 0.04 .

Данные изменения биоэнергетических характеристик митохондрий, вероятно, были обусловлены изменениями физико-химических свойств липидного компонента мембран. Инкубация митохондрий с 10^{-8} М препарата вызывала 15% снижение микровязкости, измеренной зондом I (свободный липидный бислой) по сравнению с контролем (рис. 2а). В то же время микровязкость, измеренная зондом II (зона липидов, связанная с белковыми доменами), возрастала на 20% (рис. 2б). Специфические изменения микровязкости, наблюдаемые в области аннулярных липидов мембран, по-видимому свидетельствуют об изменении белок-липидного взаимодействия,

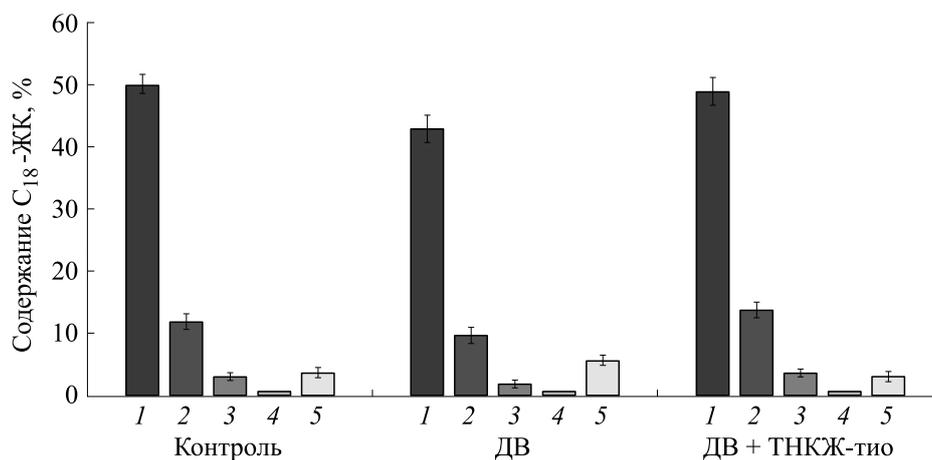


Рис 3. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное содержание С18 жирных кислот в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось абсцисс: 1 – 18:2 ω6, 2 – 18:3 ω3, 3 – 18:1 ω9, 4 – 18:1 ω7, 5 – 18:0; ось ординат – относительное содержание (в %) С18 жирных кислот в мембранах митохондрий проростков гороха.

Таблица 3. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха

Группа	V_2	V_3	V_4	V_3/V_4	ДНФ
Контр	25.22 ± 2.21	80.53 ± 3.10	35.32 ± 1.71	2.28 ± 0.01	72.85 ± 1.95
Дефицит воды	37.35 ± 1.15	49.00 ± 2.40	27.50 ± 1.23	1.78 ± 0.01	44.00 ± 1.12
Дефицит воды + 10 ⁻⁸ М ТНКЖ-тио	41.66 ± 2.00	76.68 ± 2.91	28.01 ± 1.54	2.74 ± 0.02	68.65 ± 2.01

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ НЕРЕС-Tris буфер (рН 7.2), 5 мМ КН₂Р₄, 4 мМ MgCl₂, 0.1% БСА, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10⁻⁶ М карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразона. Скорости окисления (представлены в нг атом О₂/мг белка·мин): V_2 – скорость окисления субстратов, V_3 – скорость окисления субстратов в присутствии АДФ; V_4 – скорость окисления в состоянии покоя (скорость окисления субстрата при истощении АДФ). Число повторов – 8.

что, вероятно, сказалось на активности ферментов, ассоциированных с мембранами, а, следовательно, на активности дыхательных ферментов митохондрий. Отметим, что разнонаправленные изменения микровязкости разных фаз мембран характерны при нормальном функционировании органелл клеток [27].

Учитывая влияние данной концентрации препарата на структурные характеристики мембран митохондрий и биоэнергетику этих органелл, 10⁻⁸ М ТНКЖ-тио мы использовали для изучения его антистрессовых свойств на модели дефицита воды. Дефицит воды приводил к снижению содержания основных ЖК, входящих в состав кардиолипина: линолевой кислоты на 14,5% и линоленовой кислоты – на 19% (рис. 3). При этом наблюдалось повы-

шение содержания насыщенных ЖК (С_{14:0}, С_{17:0}, С_{18:0}, С_{20:0}). В результате отношение Σ С ненасыщенных ЖК / Σ С насыщенных ЖК снизилось с 2.79 ± 0.02 до 2.15 ± 0.01, что, вероятно, увеличивало ригидность мембран митохондрий. Изменения в жирнокислотном составе мембран этих органелл сопровождалось снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов на 39%, а также 12%-м снижением эффективности окислительного фосфорилирования (табл. 3). Обработка семян гороха 10⁻⁸ М препарата предотвращала изменения состава ЖК мембран митохондрий в условиях стресса и обусловленные этим изменения биоэнергетических характеристик митохондрий. При этом эффективность окислительного фосфорилирования возрастала на 20%.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных данных можно прийти к заключению, что ТНКЖ-тио влиял на структурные характеристики мембран митохондрий проростков гороха. Это влияние имело дозозависимость: в концентрации 10^{-4} М препарат вызывал нарушение структурных характеристик мембран, что влекло за собой дисфункцию митохондрий. Существенное влияние на биоэнергетические характеристики митохондрий оказывал ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М. В этой концентрации препарат увеличивал эффективность окислительного фосфорилирования за счет некоторого снижения скоростей транспорта электронов в состоянии покоя (после истощения АДФ).

Использование препарата в качестве адаптогена к стрессовым воздействиям, в частности к дефициту воды, показало, что 10^{-8} М ТНКЖ-тио обеспечивал эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий за счет сохранения/увеличения пула основных ЖК, входящих в состав кардиолипина – линолевой и линоленовой кислот, а также ненасыщенных ЖК, способствующих поддержанию текучести мембран. Таким образом антистрессовые свойства препарата в основном обусловлены его антиоксидантной активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают огромную благодарность сотруднику Института проблем химической физики РАН д.х.н. Н.А. Саниной за предоставление для исследований натрий- μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Академии наук (номер темы 44.4-1201253310).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Plotnikov, A. Chupyrkina, A. Vasileva, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, S58 (2008).
2. А. Е. Шиков, Т. В. Чиркова и В. В. Емельянов, *Экологич. генетика*, **19** (4), 343 (2021). DOI: 10.17816/ecogen75975
3. А. А. Starkov, *Biosci. Rep.*, **17** (3), 273 (1997). DOI: 10.1023/a:1027380527769
4. P. Ch. Ikwegbue, P. Masamba, B. E. Oyinloye, and A. P. Kappo. *Pharmaceuticals (Basel)*, **11** (1), 2 (2018). DOI: 10.3390/ph11010002
5. D. Pastore, D. Trono, M. N. Laus, et al., *J. Exp. Bot.*, **58** (2), 195 (2007). DOI: 10.1093/jxb/erl273
6. J. Jayawardhane1, D. W. Cochrane, P. Vyas, et al., *Front. Plant Sci.* (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00566
7. R. B. SNabi., R. Tayade, A. Hussain, et al., *Environ. Exp. Bot.*, **161**, 120 (2019). DOI: 10.1016/J.ENVEXP-BOT.2019.02.003
8. P. Santisree, P. Bhatnagar-Mathur, and K. K. Sharma, *Funct. Plant Biol.*, **45** (2), 267 (2017). DOI: 10.1071/FP16324
9. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. M. Alam, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 9643 (2013). Doi: 10.3390/ijms14059643
10. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, 2015).
11. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. M. Alam., and M. Fujita, *Austral. J. Crop Sci.*, **6** (8), 1314 (2012)
12. F. Groß, J. Durner, and F. Gaupels, *Front. Plant Sci.*, **4**, 419 (2013). DOI: 10.3389/fpls.2013.00419
13. F. Van Breusegem, E. Vranová, J. F. Dat, and D. Inze, *Plant Sci.*, **161**, 405 (2001). DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00452-6
14. K. J. Gupta, A. Kumari, I. Florez-Saras, et al., *J. Exp. Bot.*, **69** (14), 3413 (2018). DOI: 10.1093/jxb/ery119
15. K. J. Gupta and W. M. Kaiser, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 576 (2010). DOI: 10.1093/pcp/pcq022
16. M. Stoimenova, A. U. Igamberdiev, K. J. Gupta, and R. D. Hill, *Planta*, **226**, 465 (2007). DOI: 10.1007/s00425-007-0496-0/
17. Ф. М. Шакирова, *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция* («Гилем», Уфа, 2001).
18. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (19), 10356 (2021). DOI: 10.3390/ijms221910356
19. I. Zhigacheva, V. Binyukov, E. Mil, et al., *Curr. Chem. Biol.*, **14**, 203 (2020) DOI: 10.2174/2212796814999200907162619
20. Н. А. Санина и С. М. Алдошин, *Изв. РАН. Сер. хим.*, **7**, 1199 (2011)
21. В. Н. Попов, Э. К. Рууге и А. А. Старков, *Биохимия*, **68** (7), 910 (2003).
22. J. P. Carreau and J. P. Dubacq, *J. Chromatogr. A*, **151**, 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
23. Y. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, and J. S. Sim, *Poult Sci.*, **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168 PMID: 10947186.
24. R. V. Golovina and T. E. Kuzmenko, *Chromatography (Basel)*, **10**, 545 (1977). DOI: 10.1007/BF02262915
25. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., *Биохимия*, **36** (6), 1149 (1972)
26. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейман, *Высокомолекуляр. соединения*, **10A**, 1930 (1968).

27. А. Н. Голощачов, Е. Б. Бурлакова, Биофизика, **25** (1), 97 (1980).
28. L. Adzibbli, E. P. Sokolov, S. Ponsuksili, and I. M. Sokolova, J. Exp. Biol. **225** (1), 243304 (2022). DOI: 10.1242/jeb.243304
29. A. Navarro and A. Boveris, Am. J. Physiol. Cell Physiol., **292** (2), 670 (2007). DOI: 10.1152/ajpcell.00213.2006
30. G. Paradies, G. Petrosillo, M. Pistolese, et al., Circ. Res., **94** (1), 53 (2004). DOI: 10.1161/01.RES.0000109416.56608.64

Sodium μ 2-Dithiosulfate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate Increases the Efficiency of the Respiratory Chain Activity in Mitochondria of Pea Seedlings

I.V. Zhigacheva*, N.I. Krikunova*, I.P. Generozova**, P.A. Butsanets**, N.Yu. Gerasimov*, O.V. Nevrova*, S.V. Vasiliev**, and A.N. Goloshchapov*

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

The present study was designed to investigate the antistress properties of the nitric oxide donor of the ferric-thiosulfate complex of sodium μ 2-dithiosulfate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (TNIC-thio), where the effects of different concentrations of the donor on the functional state of mitochondria isolated from pea seedlings were studied. Incubation of mitochondria with 10^{-4} M of the drug led to a sharp decrease in microviscosity of a freestanding lipid bilayer. This is attributable to a rise in the content of unsaturated fatty acids in the lipid fraction of mitochondrial membranes. At the same time, the drug uncoupled the processes of oxidation and phosphorylation. Treatment of mitochondria with 10^{-8} M TNIC-thio brought about an increase (by 25–45%) in the content of unsaturated C_{20} fatty acids, that could cause a 15% drop in microviscosity of the freestanding lipid bilayer. However, microviscosity in the annular lipid region of the membranes increased by 20%, thus, indicating that the activity of mitochondrial respiratory chain enzymes altered. Indeed, the drug affected the oxidation rates of NAD-dependent substrates and succinate and increased the efficiency of oxidative phosphorylation. This concentration of the drug was chosen to study the ability of TNIC-thio to improve the resistance of pea seedlings during water deficit. TNIC-thio prevented changes in the fatty acids composition of mitochondrial membranes in the conditions of water deficit and stress-induced changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria. The findings of the study suggest that the protective properties of the drug are developed at the membrane level due to the preservation/increase of the pool of unsaturated fatty acids contributing to the maintenance of membrane fluidity.

Keywords: mitochondria, nitric oxide, microviscosity, freestanding lipid bilayer, annular lipids, fatty acids