

## СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУРОСТАНОЛОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ЛЮЦЕРНЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ И ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2022 г. Л. А. Волкова<sup>а</sup>, В. В. Урманцева<sup>а</sup>, А. Б. Бургутин<sup>а</sup>, А. М. Носов<sup>а, б,\*</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

\*e-mail: al\_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 24.11.2021 г.

Проведено изучение механизмов адаптогенного действия фуростаноловых гликозидов (ФГ) на клетки растений *in vitro* и осуществлено сопоставление воздействия гипотермии и гиперосмотического стресса на суспензионную культуру клеток люцерны (*Medicago sativa* L.). Показано, что популяция клеток люцерны *in vitro* обладает функциональными особенностями, определяющими разную чувствительность к действию указанных абиотических стрессоров, что выражалось в разном уровне жизнеспособности клеток: высокой (85%) в условиях гипотермии и низкой (25%) при гиперосмотическом воздействии. Гипотермия стимулировала скорость генерации супероксид-аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ), ей сопутствовала высокая конститутивная активность антиоксидантных ферментов (гваякол-зависимой пероксидазы, аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы), уровень которых отражает компенсаторный потенциал клеток. Сохранение высокого уровня жизнеспособности клеток при действии гипотермии, несмотря на 40% повышение скорости генерации  $O_2^{\cdot-}$ , свидетельствует о том, что образовавшиеся активные формы кислорода не вызывали повреждения липидных структур и макромолекул в клетках. Экзогенная обработка ФГ при этом виде стрессового воздействия способствовала повышению активности антиоксидантных ферментов, однако не оказывала заметного влияния на изначально высокий уровень жизнеспособности клеток. В условиях гиперосмотического стресса предварительное воздействие ФГ приводило к 3-кратному увеличению выживаемости клеток (с 25 до 73%) и повышению на 30% активности растворимой пероксидазы по сравнению с ее уровнем при влиянии только стрессора. Воздействие ФГ также вызывало повышение активности антиоксидантных ферментов, снижение уровня перекисного окисления липидов и повышение активности ферментов малатдегидрогеназного (МДГ) комплекса. Однако, в отличие от гипотермии, наблюдаемые изменения вызывали существенное повышение жизнеспособности клеток люцерны *in vitro*. На увеличение образования осмолитов в реакциях НАД/НАД<sup>+</sup>-Н-МДГ указывала повышенная в сравнении с контролем концентрация осмотика (маннита), вызывающего начальную степень плазмолиза клеток. Обсуждаются особенности культуры клеток люцерны, влияющие на специфику ее стресс-устойчивости, возможные механизмы защиты клеток *in vitro* при гипотермии и гиперосмотическом стрессе и роль ФГ в этих процессах.

**Ключевые слова:** *Medicago sativa*, суспензионная культура клеток, фуростаноловые гликозиды, гипотермия, гиперосмотический стресс, антиоксидантные ферменты

DOI: 10.31857/S0015330322030174

### ВВЕДЕНИЕ

Фуростаноловые гликозиды (ФГ) являются высокоактивными соединениями, способными усиливать адаптивные реакции растительных кле-

ток при воздействии абиотических стрессовых факторов. В предыдущих работах нами было показано, что предварительная обработка клеток *in vitro* ФГ, выделенными из культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall., приводила к изменению ряда их физиолого-биохимических характеристик, имеющих адаптогенную направленность в условиях абиотического стресса [1–5]. В частности, экзогенное действие ФГ способствовало образованию

**Сокращения:** АПО – аскорбатпероксидаза, ГПО – глутатионпероксидаза, ПО – пероксидаза, СОД – супероксиддисмутаза, ТБК-АП – активные продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, ФГ – фуростаноловые гликозиды.

АФК, генератором которых являлась НАДФ·Н-оксидаза плазмалеммы, и индукции ферментов антиоксидантной защиты. Активация НАДФ·Н-оксидазы приводила к изменению соотношения НАДФ<sup>+</sup>/НАДФ·Н, что может выполнять роль редокс-сигнала, который регулирует активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути и ферментов метаболизма глутатиона.

Механизмы, лежащие в основе защиты клеток при действии разных видов стрессоров, могут иметь специфичные особенности. Известно, что при действии гипотермии основными негативными последствиями являются снижение текучести мембран и окислительный стресс, связанный в первую очередь с нарушением транспорта электронов в электрон-транспортных цепях. Воздействии низкой температуры может приводить к быстрому повышению содержания Са<sup>2+</sup> в цитозоле, связанном с активацией НАДФ·Н-оксидазы [6]. В результате происходит формирование внутриклеточных АФК, при этом их продукция и активация антиоксидантных ферментов является результатом быстрых сигнальных реакций [7]. Активация антиоксидантной системы, наряду с повышением ненасыщенности ЖК в составе липидов мембран играет ключевую роль в формировании устойчивости к гипотермии [8]. В защиту от токсичного действия АФК вовлечены такие ключевые ферменты, как аскорбатпероксидазы (АПО) и супероксиддисмутазы (СОД), а также глутатионпероксидазы (ГПО) и фенол-зависимые пероксидазы. Поскольку пероксидаза (ПО) имеет различные функции (оксидазную и пероксидазную), она может выступать как фактор, участвующий в элиминировании Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, а в других ситуациях – как источник кислородных радикалов. Учитывая такую двойственность, пероксидазная ферментная система представляется одним из наиболее вероятных участников клеточного сигналинга. Уровень активности фенол-зависимой ПО в клетках растений часто используют для характеристики их функционального состояния в ответ на действие экстремальных факторов среды [9]. Эффективность антиоксидантных ферментов, которые защищают разные компартменты клетки в условиях абиотического стресса, может зависеть не только от их индуцированной, но и конститутивной активности.

При другом виде стресса – гиперосмотическом, при котором существенную роль играют механические свойства мембран [10], компенсаторные изменения, противостоящие повреждающим эффектам, включают в себя осмопротекторные механизмы, связанные с повышением уровня осмолитов, предупреждающих пороговое обезвоживание. Кроме того, регуляция активности антиоксидантных ферментов, замедляющих интенсивность липопероксидации, а также активация альдегидути-

лизирующих ферментов, защитное действие которых проявляется как за счет метаболизма токсичных альдегидов, так и в результате образования осмолитов [5], способствуют сопротивлению клеток гиперосмотическому стрессу.

Для выяснения механизмов адаптогенного действия ФГ на растительные клетки *in vitro* эффективным подходом является использование объектов со специфичными свойствами. Суспензионная культура клеток люцерны (*Medicago sativa* L.), восстановленная после 27 лет криогенного хранения в жидком азоте, обладает рядом функциональных особенностей – в частности, активность гваякол-ПО в ней на несколько порядков выше, чем в других исследуемых растительных объектах *in vitro* [4]. После длительного криогенного хранения популяция клеток люцерны возобновила рост, несмотря на низкий уровень выживаемости, что свидетельствует о высоком адаптивном потенциале клеток возобновленной культуры. Основным повреждающим фактором в результате процедуры замораживания-оттаивания является гиперосмотический стресс, к которому клетки люцерны были довольно чувствительны (погибало около 80% преимущественно полиплоидных клеток) [11]. Наряду с действием гиперосмотического стресса в процессе замораживания-оттаивания клетки подвергались также действию низкой положительной температуры.

В связи с этим целью настоящей работы заключалась в изучении механизмов, лежащих в основе защитного действия ФГ на клетки возобновленной после криогенного хранения суспензионной культуры *Medicago sativa*, при действии гипотермии и гиперосмотического стресса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на восстановленной после 27 лет хранения в жидком азоте суспензионной культуре клеток люцерны (*Medicago sativa* L.) в условиях выращивания, описанных в работе Волковой с соавт. [11]. Для определения оптимальной интенсивности стрессовых факторов была также использована хорошо охарактеризованная нами ранее суспензионная культура клеток *Dioscorea deltoidea* Wall, штамм ИФР ДМ-0.5 [3].

Для изучения влияния ФГ на клетки люцерны использовали препарат фураностаноловых гликозидов, выделенный из водного экстракта лиофильно высушенной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall, штамм ИФР ДМ-0.5 [3]. Препарат представляет собой смесь двух гликозидов – дельтозида и протодиосцина, в соотношении 2 : 3 с чистотой 85%. Для изучения действия ФГ клетки отбирали в течение цикла роста в определенные сутки культивирования (на 2, 7, 14 сут; либо на 7 и 14 сут), которые соответствовали разным

фазам ростового цикла (2 сут – лаг фаза, 7 сут – фаза экспоненциального роста, 14 сут – фаза замедления роста) и проводили 60-минутную экспозицию с ФГ в концентрации  $10^{-5}$  М. Контролем служили клетки без воздействия. Подробная методика изложена ранее [5].

**Жизнеспособность суспензионных культур** определяли с помощью окрашивания клеток 0.1% раствором феносафранина, как описано в работах [3]. При микроскопировании (световой микроскоп PZO, Польша) учитывали процент неокрашенных (живых) клеток не менее чем в 200 клеточных агрегатах.

**Условия гиперосмотического стресса** создавали, воздействуя на клетки через каждые 5 мин раствором маннита с постепенно повышающейся концентрацией (0.3; 0.6; 0.8 и 1.1 М). При концентрации 1.1 М клетки выдерживали в течение 1 ч. Затем клетки в течение 20 мин ступенчато деплазмолизировали, после чего определяли их жизнеспособность (выживаемость).

**Гипотермическое воздействие** состояло в том, что колбы с культурами клеток люцерны и диоскореи помещали в холодильную камеру на 60 мин при периодическом помешивании. При этом экспозицию клеток люцерны осуществляли при 4°C, а диоскореи – при 7°C.

**Определение активности редокс-ферментов.** После гомогенизации осажденных клеток суспензии (150–200 мг) в 0.1 М Трис-НСI буфере (рН 7.5) и последующего центрифугирования гомогената при 10000 g в течение 10 мин (центрифуга Eppendorf 5414) в супернатантах определяли активность ферментов.

**Активность гваякол-зависимой формы пероксидазы** (КФ 1.11.1.7) определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 5.5) при 470 нм [12]. Снижение активности гваякол-зависимой ПО, вызванное присутствием в реакционной среде второго субстрата – НАД·Н, определяли по методу, описанному в работе [4]. Определение пероксидазной активности производили, как описано выше [12]. Для сравнения разных вариантов величину снижения активности гваякол-зависимой ПО (А, %) вычисляли по формуле:  $A (\%) = 100 \times (1 - A1/A2)$ , где А1 – активность фермента (ммоль/(мг белка мин)) после внесения НАД·Н, А2 – исходная активность фермента, без НАД·Н.

**Общую активность супероксиддисмутазы** (СОД, КФ 1.15.1.11) определяли с использованием нитросинего тетразолия, конкурирующего с СОД за супероксид-анионы, образующиеся в результате взаимодействия метионина и рибофлавина при освещении в течение 30 мин, по методу Beauchamp и Fridovich [13]. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли при 560 нм. Полученные данные по активности фермента выражали в

относительных единицах на мг белка. За единицу активности СОД принимали 50% ингибирование образования формазана, образуемого при восстановлении нитросинего тетразолия.

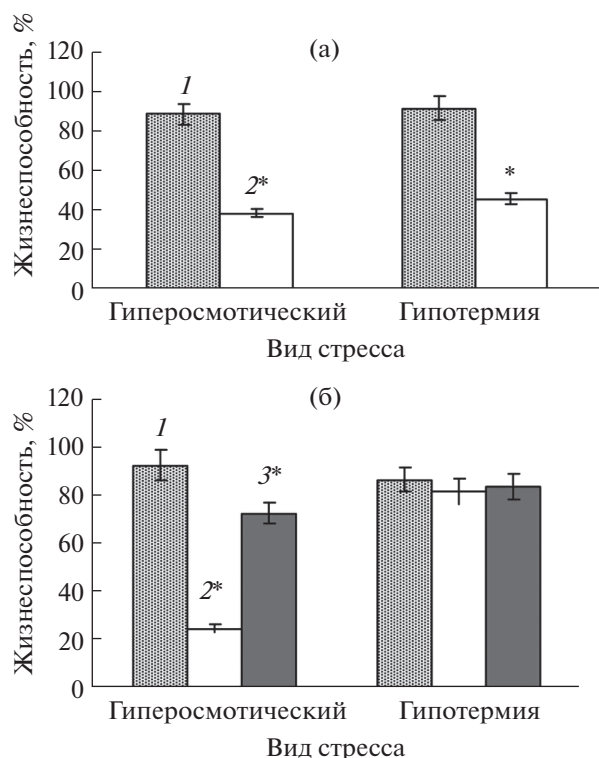
**Активность глутатионпероксидазы** (ГПО, КФ 1.11.1.9) определяли по скорости уменьшения оптической плотности реакционной смеси при 340 нм в результате окисления НАДФ·Н с помощью двух сопряженных ферментативных реакций: генерации окисленного глутатиона (GSSG) под действием глутатионредуктазы и его последующего восстановления ГПО с использованием НАДФ·Н в качестве кофермента [14]. Снятие показаний осуществляли ежеминутно в течение 5 мин. Реакционная среда имела следующий состав: 50 мМ Трис-НСI буфер (рН 7.4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0.12 мМ НАДФ·Н, 0.85 мМ восстановленного глутатиона (GSH), 0.37 мМ  $H_2O_2$ , 1 ед/мл глутатионредуктазы. В контрольной пробе отсутствовал GSH. Активность ГПО рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции ( $\epsilon = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и выражали в мкмоль/(мг белка мин).

**Активность аскорбатпероксидазы** (АПО, КФ 1.11.1.11) определяли по уменьшению оптической плотности при 298 нм в результате окисления аскорбиновой кислоты перекисью водорода ( $\epsilon = 0.80 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [15]. Для каждого определения проводили также контрольное измерение неспецифического окисления аскорбата. Активность АПО выражали в ммоль окисленного аскорбата/(мг белка мин).

**Активность НАД-малатдегидрогеназы** (НАД-МДГ, КФ 1.1.1.37) определяли по скорости восстановления НАД в среде следующего состава: 80 мМ Трис-НСI буфер (рН 8.0), 2 мМ малат, 5 мМ  $MgSO_4$ , 0.2 мМ НАД. Активность НАД-МДГ рассчитывали, используя среднюю скорость светопоглощения при 340 нм за первые 3 мин после начала реакции.

**Активность НАД·Н-малатдегидрогеназы** (НАД·Н-МДГ, КФ 1.1.1.37) определяли по скорости расходования НАД·Н в среде следующего состава: 80 мМ Трис-НСI буфер (рН 8.0), 2 мМ оксалоацетат, 5 мМ  $MgSO_4$ , 0.2 мМ НАД·Н. Активность НАД·Н-МДГ рассчитывали, используя среднюю скорость светопоглощения при 340 нм за первые 3 мин после начала реакции.

**Скорость генерации супероксид-аниона** ( $O_2^{\cdot-}$ ) регистрировали по методу, основанному на способности  $O_2^{\cdot-}$  восстанавливать нитросиний тетразолий до нерастворимого формазана [16]. Качественное определение формазана проводили по методу, описанному нами ранее [3]. Контрольные и обработанные ФГ клетки инкубировали 60 мин в 0.3% растворе нитросинего тетразолия в фосфатном буфере (рН 7.0), при этом восстанов-



**Рис. 1.** Жизнеспособность клеток диоскореи (а) и люцерны (б) в условиях гипотермии и гиперосмотического стресса: 1 – контроль; 2 – стресс; 3 – ФГ. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .

ление нитросинего тетразолия в клетках было спонтанным, без использования источника  $O_2^-$ . После центрифугирования при  $10000\text{ g}$  в течение 10 мин клетки дважды экстрагировали 96% этанолом для извлечения формазана. В объединенном экстракте определяли количество формазана при длине волны  $510\text{ nm}$  ( $\epsilon = 3.0\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) и выражали в мкмоль/мг белка.

**Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)** оценивали по ТБК-тесту [17], основанному на взаимодействии этих продуктов (преимущественно МДА) с тиобарбитуровой кислотой и образовании окрашенных комплексов, при наличии высокой температуры и кислой среды. Содержание ТБК-АП рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции МДА, равного  $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  и выражали в нмоль/мг белка.

**Определение общего количества белка** проводили по методу Lowry с соавт. [18].

**Статистическую обработку данных** проводили по общепринятым методикам с использованием программы Microsoft Excel 2007. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Бары на диаграммах означают стандартную ошибку. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости  $P \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Жизнеспособность клеток люцерны при действии ФГ в условиях гипотермии и гиперосмотического стресса*

Для определения оптимальной интенсивности стрессовых факторов была использована хорошо охарактеризованная суспензионная культура клеток *D. deltoidea* Wall. Гиперосмотический стресс (выдерживание клеток в  $1.1\text{ M}$  растворе маннита в течение 1 ч, см. Материалы и методы) и гипотермический стресс (1 ч при  $4^\circ\text{C}$ ) вызывали практически одинаковое снижение жизнеспособности клеток – с 90% в контроле до 41% при гиперосмотическом стрессе и до 46% при гипотермии (рис. 1а), что может свидетельствовать об оптимальном уровне выбранных режимов воздействий и их “эквивалентности” для клеток диоскореи *in vitro*.

В отличие от клеток диоскореи, воздействие на суспензионные культуры клеток люцерны абиотических стрессоров разной природы привело к различному эффекту (рис. 1б). Гипотермия практически не оказала влияние на жизнеспособность клеток люцерны *in vitro*, тогда как гиперосмотический стресс вызвал более существенное по сравнению с клетками диоскореи (почти 4-кратное) снижение жизнеспособности – с 93% (контроль) до 25%.

В условиях гиперосмотического стресса предобработка клеток люцерны ФГ повышала выживаемость с 25% (в варианте без ФГ) до 73%. В условиях действия низкой температуры жизнеспособность клеток люцерны *in vitro* во всех вариантах (контроль, гипотермия, гипотермия + ФГ) практически не изменялась и находилась на уровне  $85 \pm 3\%$ .

### *Скорость генерации супероксид-аниона при действии ФГ в условиях гипотермии*

Гипотермия и обработка клеток люцерны ФГ на 7 или 14 сут культивирования стимулировали образование  $O_2^-$  (рис. 2). Превышение контроля при действии только гипотермии составило 39% на 7 сут выращивания и 36% – на 14 сут, а воздействие ФГ в контрольных условиях (при нормальной температуре) – 20 и 24%, соответственно. Воздействие на клетки ФГ в условиях холодного стресса также приводило к повышению уровня образования в них  $O_2^-$ , но в меньшей степени, чем воздействие только стрессового фактора. По сравнению с контролем степень превышения скорости образования  $O_2^-$  при воздействии ФГ на 7 сут составляла 17%, на 14 сут – 19%, что в среднем на 20% ниже уровня его генерации при действии только гипотермии.

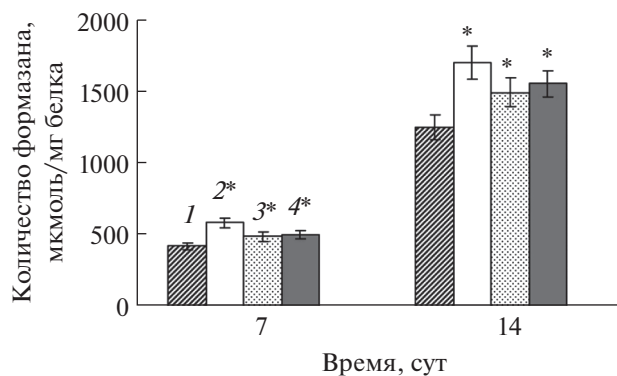
*Пероксидазно-оксидазная активность пероксидазы (ПО) при действии ФГ в условиях гипотермии*

Активность ПО в клетках люцерны измеряли как в окислительном цикле (с использованием НАД·Н в качестве субстрата), так и пероксидазном (с использованием фенолов в качестве субстрата). Присутствие в реакционной среде наряду с гваяколом сильного восстановителя НАДФ·Н приводило к снижению пероксидазной активности в контрольном варианте (в результате переключения на оксидазную активность) на 7 сут цикла выращивания на 37%, а на 14 сут – на 29% (рис. 3). При действии гипотермии пероксидазная активность увеличивалась на 24 и 29% (на 7 и 14 сут, соответственно), а оксидазная активность ПО либо не изменялась (7 сут), либо незначительно (недостаточно) снижалась (14 сут). Предкультивирование клеток люцерны с ФГ способствовало увеличению пероксидазной активности (на 7 сут на 17%, на 14 сут – на 19%), однако в условиях гипотермии эффект ФГ не наблюдался.

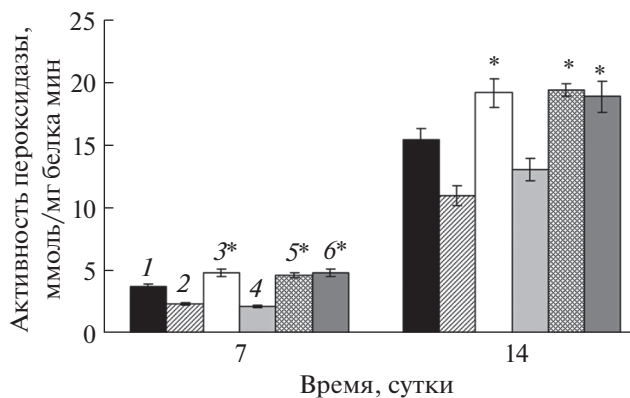
*Активность антиоксидантных ферментов при действии ФГ*

Исследование функционирования антиоксидантных ферментов в клетках люцерны показало высокий уровень их конститутивной активности, имеющий циклический характер. При этом в начале цикла выращивания (2 сут) их активность была максимальной, в период интенсивного роста клеток (7 сут) она снижалась, но к завершению цикла (14 сут) опять возрастала. Активность СОД на 2 сут культивирования составляла 7.0, на 7 сут – 0.9 и на 14 сут – 2.9 отн. ед./мг белка. Активность аскорбат ПО – соответственно 2.0, 0.65 и 1.9 ммоль окисленного аскорбата/мг белка в мин; активность глутатион ПО – 800, 280 и 470 мкмоль GSSG/мг белка в мин. Зафиксированное повышение активности антиоксидантных ферментов в лаг-фазе цикла (2 сут) выращивания культур клеток фиксируется достаточно часто и может быть обусловлено активацией митохондриального дыхания после пересадки клеток на свежую питательную среду.

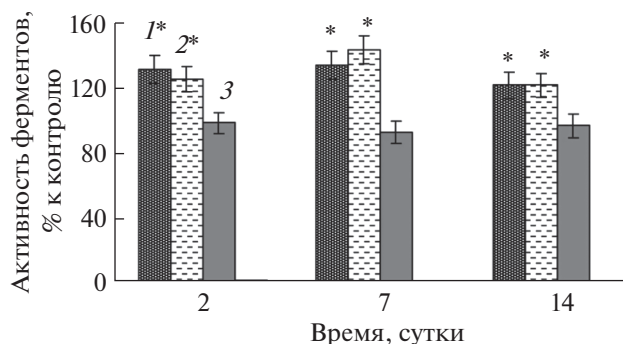
Изучение динамики активности антиоксидантных ферментов при воздействии ФГ показало (рис. 4), что предварительная инкубация клеток люцерны с ФГ приводила к повышению активности СОД на 21–36% по сравнению с контролем в зависимости от фазы ростового цикла культуры, что свидетельствует об увеличении образования  $O_2^-$ . Аналогичное повышение активности было зафиксировано и для АПО: на 21–43% от уровня активности в контроле, тогда как изменений активности ГПО при действии ФГ в цикле выращивания клеток обнаружено не было –



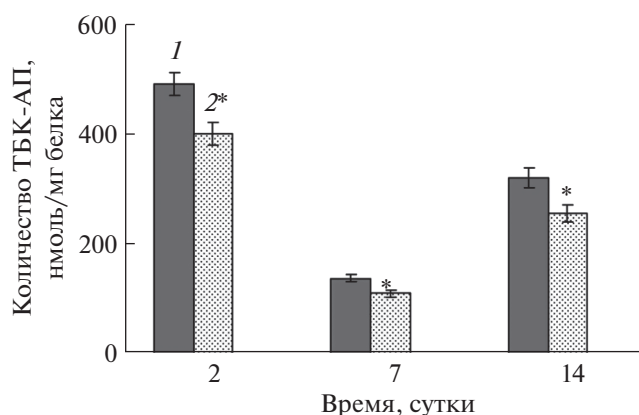
**Рис. 2.** Скорость генерации супероксид-аниона при экспозиции фураностаноловых гликозидов (ФГ) с клетками люцерны в условиях гипотермии: 1 – контроль; 2 – гипотермия; 3 – ФГ + гипотермия; 4 – ФГ. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .



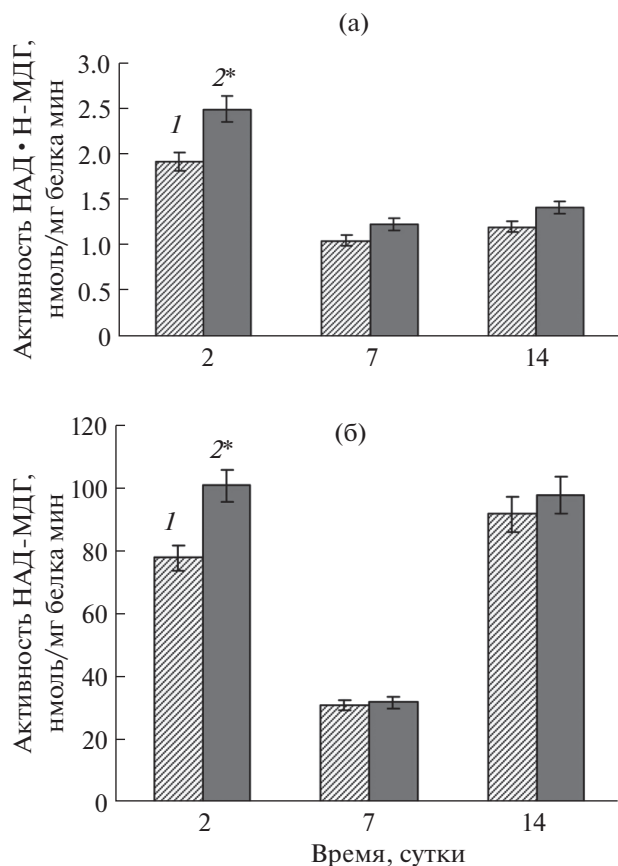
**Рис. 3.** Peroксидазно-оксидазная активность пероксидазы в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) в условиях гипотермии: 1 – контроль; 2 – НАД·Н; 3 – гипотермия; 4 – НАД·Н + гипотермия; 5 – ФГ; 6 – ФГ + гипотермия. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 4.** Активность антиоксидантных ферментов в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов: 1 – СОД; 2 – АПО; 3 – ГПО. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 5.** Количество ТБК-АП в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль; 2 – ФГ. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 6.** Активность ферментов маламдегидрогеназного (МДГ) комплекса (а – НАД·Н-МДГ, б – НАД-МДГ) в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль; 2 – ФГ. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .

ее активность оставалась на уровне конститутивных значений контрольного варианта.

#### *Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) при действии ФГ*

Динамика интенсивности ПОЛ в цикле выращивания клеток люцерны оказалась схожей с динамикой активности антиоксидантных ферментов – более высокие значения были отмечены в начале и конце цикла культивирования (рис. 5). Воздействие ФГ на клетки приводило к уменьшению количества в них ТБК-АП на 19–22% по сравнению с контрольным вариантом независимо от фазы ростового цикла, в котором происходила обработка ФГ.

#### *Активность ферментов маламдегидрогеназного комплекса*

Анализ динамики активности НАД·Н-МДГ (рис. 6а), катализирующей восстановление оксалоацетата в малат, показал, что действие ФГ способствовало увеличению ее активности по сравнению с контролем на 18–30% в зависимости от фазы ростового цикла. В отличие от НАД·Н-МДГ, обработка клеток люцерны ФГ приводила к существенному (на 23%) повышению активности НАД-МДГ, катализирующей окисление малата в оксалоацетат лишь в начале выращивания (на 2 сут) (рис. 6б). Влияние ФГ на активность этого фермента в остальные фазы ростового цикла либо отсутствовало (обработка на 7 сут), либо было незначительным (обработка на 14 сут).

#### *Уровень пероксидазной активности при действии ФГ в условиях гиперосмотического стресса*

Обработка ФГ клеток люцерны в нормальных условиях культивирования приводила к достоверному (на 20–25%) повышению уровня пероксидазной активности по сравнению с контролем (рис. 7). Условия гиперосмотического стресса вызвали существенное (в зависимости от фазы ростового цикла – в 3–4 раза по сравнению с контролем) снижение уровня этой активности. Воздействие ФГ в условиях гиперосмотического стресса приводило к “нормализации” пероксидазной активности в клетках: она оказывалась в 1.7–1.8 раза ниже по сравнению с контрольным уровнем, но в 1.8–2.4 раза выше, чем в стрессовых условиях без воздействия ФГ.

#### *Образование начального плазмолиза при действии ФГ в условиях гиперосмотического стресса*

При использовании маннита в концентрации 0.3 М начальный плазмолиз в контрольном варианте наблюдался во всех клетках люцерны. При

воздействии ФГ начальный плазмолиз в паренхимоподобных клетках с крупной вакуолью был зафиксирован при концентрации 0.4 М осмотика, а в более мелких изодиаметрических меристемоподобных клетках (их доля в популяции клеток составляла около 30%) – при 0.6 М маннита. При концентрации маннита 1.1 М сильный плазмолиз клеток (уменьшение объема цитоплазмы на 50% и более) был зафиксирован для всех клеток во всех вариантах эксперимента.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы противостоять гипотермии и гиперосмотическому воздействию в растительных клетках имеются механизмы, позволяющие посредством сложного пути передачи сигнала включать соответствующие адаптивные физиологические реакции. Известно, что холодовой стресс характеризуется активацией окислительных процессов в клетке [19]. Ограничение процессов ПОЛ и поддержание структурно-функционального состояния мембранных липидов осуществляется за счет работы антиоксидантной системы защиты, ключевую роль в которой играют специализированные ферменты [19], среди которых ПО одной из первых реагирует на любые внешние воздействия [20]. В нашем исследовании, в отличие от культивируемых клеток диоскори (рис. 1а), холодовое воздействие (4°C, 60 мин) не влияло на жизнеспособность клеток люцерны (рис. 1б), оставаясь на уровне контроля (86%), но наблюдались изменения на биохимическом уровне. Так, определение активности ПО при действии гипотермии показало ее увеличение в цикле роста на 24–29%, при этом, не было зарегистрировано достоверного влияния на уровень оксидазной (прооксидантной) активности (рис. 3). Увеличение активности ПО при совместном действии гипотермии и ФГ может быть связано с повышением уровня  $H_2O_2$  вследствие усиления образования  $O_2^-$  (рис. 2) и активности СОД (рис. 4), которая дисмутирует  $O_2^-$  в  $H_2O_2$  и молекулярный кислород. Известно, что СОД (в частности, Cu/Zn-СОД) может быть основным источником  $H_2O_2$  в апопластном компартменте [21]. Стоит заметить, что при гипотермии уровень  $O_2^-$  в контрольном варианте был выше на 12–19%, по сравнению с действием ФГ в обычных условиях, что свидетельствует о нестрессовом характере проявления эффекта ФГ (рис. 2). Высокий уровень жизнеспособности клеток люцерны при действии гипотермии (рис. 1б) свидетельствует о том, что образовавшиеся АФК не вызывали повреждений липидных структур и макромолекул (ДНК, РНК, белки) в клетках, поэтому не приводили к развитию окислительного стресса, следствием которого могло быть образование существенных повреждений, нарушающих

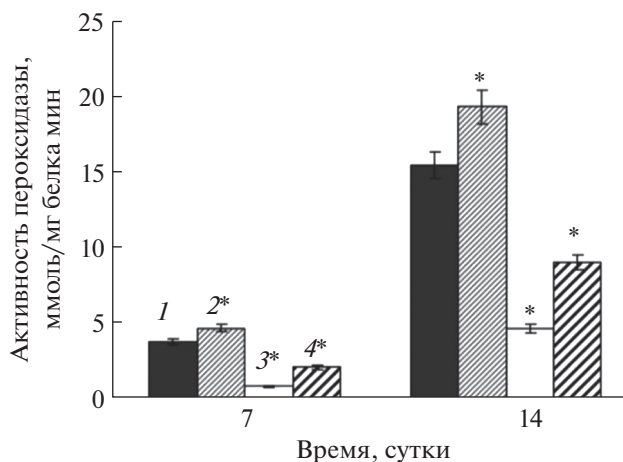


Рис. 7. Активность пероксидазы (ПО) в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) в условиях гиперосмотического стресса: 1 – контроль; 2 – ФГ; 3 – стресс; 4 – ФГ + стресс. Звездочками (\*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при  $P \leq 0.05$ .

барьерные свойства мембран. Наряду с СОД предкультивирование клеток люцерны с ФГ вызывало также увеличение активности АПО (рис. 4), являющейся составной частью аскорбат-глутатионового цикла, механизм которого заключается в восстановлении  $H_2O_2$  до воды с участием аскорбата и АПО. Участвуя в аскорбат-глутатионовом цикле, АПО снижает содержание  $H_2O_2$ , поддерживает окислительно-восстановительный баланс клетки, а также уровень глутатиона и аскорбиновой кислоты [22]. В отношении ГПО заметного изменения активности фермента при действии ФГ (рис. 4) не выявлено, что может быть связано с более низкой чувствительностью ГПО к увеличению концентрации  $H_2O_2$ . Следует обратить внимание на высокие конститутивные значения активностей исследуемых ферментов, особенно ПО – более 15 ммоль/(мг белка мин) на 14 сут культивирования (рис. 3), которая выявляется как доминирующий фермент в цикле роста. Пероксидазная (антиоксидантная) активность ПО, наряду с другими антиоксидантными ферментами, контролирует уровень АФК, тем самым осуществляя редокс-регуляцию в растительной клетке.

При действии низких температур выявляется множество зависимых эффектов, среди которых значительно выделяются видовые особенности, соответствующие генотипу растений. Например, культура клеток диоскори, полученная из корневища *D. deltoidea* Wall., была чувствительна к гипотермии уже при 7°C (рис. 1б), их жизнеспособность снижалась на 50%. Виды рода *Dioscorea* L. произрастают преимущественно в тропиках, реже в субтропиках и в умеренном климате и являются теплолюбивыми растениями, в отличие от лю-

церны, которая относится к холодостойким видам. В связи с этим устойчивость к гипотермии культуры клеток люцерны может быть генетически детерминирована и связана, в том числе, с высокой конститутивной активностью антиоксидантных ферментов, по уровню активности которых можно судить о компенсаторном потенциале клеток [23]. На этом фоне, несмотря на повышение исходного уровня активности антиоксидантных ферментов при действии ФГ, эффект последних в условиях гипотермии не наблюдался (рис. 4).

Исследуемые антиоксидантные ферменты различались чувствительностью к концентрации  $H_2O_2$ . Известно, что АПО обладает высоким сродством к  $H_2O_2$  и нейтрализует ее даже в очень низких концентрациях [24], тогда как ГПО не обладает высоким сродством к  $H_2O_2$  [25], а гваяколпероксидаза, вероятно, занимает промежуточное положение. Опосредованная способность ФГ повышать активность антиоксидантных ферментов, обладающих высоким сродством к  $H_2O_2$  (в частности АПО), может свидетельствовать об участии ФГ в сигнальных механизмах АФК-индуцируемых защитных реакций в качестве фактора, обеспечивающего необходимый уровень АФК [5, 26].

Изменение проницаемости плазмалеммы тесно связано с состоянием барьера ионной проницаемости, что является важнейшим показателем, от которого зависит нормальное функционирование клетки. Полярные липиды являются структурными компонентами клеточных мембран, участвующими в формировании барьера ионной проницаемости клеток, который может нарушаться при активации ПОЛ [27]. В результате формируются сквозные полярные каналы, вследствие чего увеличивается пассивная проницаемость мембран для ионов и снижается их электрическая стабильность. Уровень ПОЛ является одним из важных повреждающих факторов, вызывающих пробой в липидной части мембраны, приводящий к ее разрыву и, в конечном итоге, к гибели клетки [28]. Нами показано, что воздействие ФГ приводило к уменьшению количества ТБК-АП в течение цикла роста на 19–22% (рис. 5), что в условиях гиперосмотического стресса отразилось на жизнеспособности клеток люцерны, которая возросла с 25% (в контроле) до 73%.

При гиперосмотическом воздействии протопласт теряет воду, уменьшается в размерах и отделяется от клеточной стенки. Сохранению водного гомеостаза при стрессе могут способствовать органические кислоты, образуемые в реакциях ферментов МДГ комплекса. Органические кислоты имеют свойства осмолитов, благодаря чему увеличивают количество связанной воды, тем самым предотвращают критическое обезвоживание клетки. Образующиеся в реакциях НАД/НАД·Н-МДГ малат и оксалоацетат могут запасаться в вакуолях,

выполняющих важную буферную роль [29]. Кроме того, эти молекулы участвуют в реакциях переаминирования с образованием аспарагина и аланина. Аминокислоты, образуемые в результате этих реакций, также играют значительную роль в осморегуляции клеток. Анализ динамики активности оксидоредуктазных НАД·Н-МДГ (рис. 6а) и НАД-МДГ (рис. 6б) показал, что ФГ способствовали увеличению активности ферментов МДГ комплекса. Ранее в клетках люцерны нами было показано усиление активности альдегидутилизующих ферментов при действии ФГ [5]. Продуктами реакций этих ферментов являются карбоновые кислоты, которые могут выступать в качестве осмолитов.

На увеличение образования осмолитов при воздействии ФГ может указывать разная концентрация маннита, вызывающая начальную степень плазмолиза. Следует заметить, что клетки диоскорей по сравнению с люцерной были более устойчивые к действию осмотика — только у 50% клеток был отмечен начальный плазмолиз при концентрации маннита 0.3 М [30].

При действии гиперосмотического стресса происходит повреждение белков мембран клетки как в липидной фазе, так и проявляющих свою активность в водных растворах [27]. Уровень ПОЛ влияет на степень нарушения липидного бислоя мембран, ослабляя липид-белковые взаимодействия интегральных белков. Последние выходят из мембраны во внеклеточное пространство, тем самым усиливая неселективную проницаемость мембран [29, 31]. При гиперосмотическом стрессе уменьшается растворимость гидрофильных белков, изменяются форма и размеры их молекул, теряется ферментативная активность. Изменения происходят вследствие разрыва водородных и ионных связей, стабилизирующих пространственные структуры [32]. На примере ПО нами показано, что в результате действия гиперосмотического стресса активность фермента была ингибирована почти на 80% (рис. 7). Предварительная экспозиция клеток с ФГ способствовала большему сохранению (на 30%) функциональной активности ПО по сравнению с вариантом без ФГ. Видимо, это связано с повышением активности ферментов МДГ комплекса, продукты которых имеют свойства осмолитов, а также вследствие снижения уровня ПОЛ. Таким образом, наблюдаемый эффект ФГ в условиях гиперосмотического стресса свидетельствует о запуске цитопрокторных механизмов и связанных с ними регуляторных путей, показанных нами ранее [5, 26].

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00387.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в каче-



стве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Volkova L.A., Maevskaya S.N., Burgutin A.B., Nosov A.M. Effect of exogenous steroid glycosides on cultured cells of potato under oxidative stress // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 639. <https://doi.org/10.1134/S1021443707050111>
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Maevskaya S.N., Nosov A.M. Stimulation of defense responses of *in vitro* potato plants by treatment with steroid glycosides under abiotic stresses // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 928. <https://doi.org/10.1134/S1021443711040236>
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Characteristics of eliciting effects of furostanol glycosides on cultured yam cells // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 427. <https://doi.org/10.1134/S1021443718020085>
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Sensitivity of antioxidant status of plant cells to furostanol glycosides // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 784. <https://doi.org/10.7868/S0015330316060154>
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Effect of furostanol glycosides from *Dioscorea deltoidea* on redox state of alfalfa cells *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 1098. <https://doi.org/10.1134/S102144372105023X>
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 8885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708106200>
- Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 995. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>
- Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. P. 255. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Ackermann F., Stanislas T. The plasma membrane – an integrating compartment for mechano-signaling // Plants. 2020. V. 9. P. 505. <https://doi.org/10.3390/plants9040505>
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Popova E.V., Nosov A.M. Physiological, cytological and biochemical stability of *Medicago sativa* L. cell culture after 27 years of cryogenic storage // CryoLetters. 2015. V. 36(4). P. 252.
- Lin C.C., Kao C.H. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings // Plant Soil. 1999. V. 216. P. 147. <https://doi.org/10.1023/A:1004714506156>
- Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276.
- Шульгин К.К., Попов С.С., Рахманова Т.И., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Вережкин А.Н., Семенихина А.В., Гончарова Е.И. Активность глутатионпероксидазы при нарушении функции печени и выделение фермента с использованием хроматографических методов для исследования регуляторных свойств // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 6. С. 916.
- Gerbling K.-P., Kelly G.J., Fischer K.-H., Latzko E. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from Pea leaves // J. Plant Physiol. 1984. V. 115. P. 59.
- Lizskay A., van der Zalm E., Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and <sup>•</sup>OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 3114. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044784>
- Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 444. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.07.002>
- Kawano T. Roles of the reactive oxygen species generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 829. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0591-z>
- Tanaka K., Takio S., Yamamoto I., Satoh T. Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marchantia paleacea* var. diptera and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37(4). P. 523.
- Foyer C.H., Noctor G. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell // Plant Cell Environ. 2015. V. 38. P. 239. <https://doi.org/10.1111/pce.13659>
- Mehla N., Sindhi V., Josula D., Bisht P., Wani S.H. An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress / Eds. M.I.R. Khan, N.A. Khan. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017. P. 1. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
- Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва: КДУ, 2007. 140 с.
- Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи современной биологии. 2016. Т. 136. С. 181.
- Volkova L.A., Urmantseva V.V., Klyushin A.G., Burgutin A.B., Nosov A.M. Activity of respiratory pathways in cultured yam cells under the influence of furostanol glycosides // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 344. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040172>

27. *Volinsky R., Kinnunen P.K.J.* Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 2806. <https://doi.org/10.1111/febs.12247>
28. *Евстигнеев М.П., Завьялова О.С., Савченко Е.В.* Биофизика мембран: учеб. пособие // Севастополь: СевГУ. 2019. 59 с.
29. *Lokhande V.H., Suprasanna P.* Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance // *Environmental adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* / Eds. P. Ahmad, M.N.V. Prasad. Springer Science + Business Media, LLC. 2012. P. 29. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_2)
30. *Урманцева В.В., Волкова Л.А., Ульянова К.А., Куличенко И.Е., Носов А.М.* Использование перекиси водорода и дикарбоновых кислот для повышения осмоустойчивости культуры клеток *Dioscorea deltoidea* W. // *Биотехнология.* 2009. С. 14.
31. *Fruhwrth G.O., Loidl A., Hermetter A.* Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2007. V. 1772. № 7. P. 718. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.04.009>
32. *Степовая Е.А., Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Якушина В.Д., Носова А.И., Гулая В.С., Степанова Е.А., Чильчигашев Р.И., Новицкий В.В.* Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы // *Биомедицинская химия.* 2016. Т.62. С. 64. <https://doi.org/10.18097/PBMC20166201064>