

АМБИОЛ МОДУЛИРУЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2024 г. И.В. Жигачева*, #, Н.И. Крикунова*, Ю.В. Кузнецов*, А.Н. Голощапов*

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

#E-mail: zhigacheva@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Исследовано влияние регулятора роста растений амбиола на функциональное состояние митохондрий этиолированных проростков гороха. Препарат предотвращал активацию перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий в концентрационном интервале 10^{-5} – 10^{-6} и 10^{-9} М. Введение амбиола в среду инкубации этих органелл приводило к увеличению скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. При этом наиболее эффективными концентрациями являлись 10^{-5} и 10^{-6} М. Изменения в биоэнергетических характеристиках митохондрий сопровождались изменением жирнокислотного состава мембран митохондрий. Наиболее значительные изменения происходили в содержании 18:2 ω6 и 18:3 ω3 жирных кислот. Предполагается, что увеличение содержания этих жирных кислот в мембранах митохондрий свидетельствует об увеличении содержания кардиолипина, обеспечивающего эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий и, следовательно, обеспечивающего поддержание энергетического метаболизма на высоком уровне. Обработка семян гороха амбиолом не только предотвращала снижение темпов роста проростков гороха в условиях дефицита воды, но и стимулировала их рост.

Ключевые слова: митохондрии, регуляторы роста растений, перекисное окисление липидов, жирные кислоты, дефицит воды.

DOI: 10.31857/S0006302924020073, EDN: OUZHUV

В результате неполного восстановления кислорода в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов образуются активные формы кислорода (АФК), участвующие в клеточной сигнализации. Стационарный уровень АФК в органах и тканях весьма низок за счет наличия ферментативных и неферментативных систем регуляции образования и утилизации этих интермедиатов (антиоксидантной системы). Изменения в окружающей среде могут вызвать смещение антиоксидантно/прооксидантного равновесия в сторону избыточной продукции АФК, которые могут выступать в качестве клеточных сигналов, приводящих к адаптации организма к изменяющимся условиям [1]. Однако при длительном действии стрессового фактора избыточная продукция АФК может вызывать нарушение метаболизма клетки [2]. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими

в состав липидов биологических мембран, и прежде всего мембран митохондрий, приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3]. В результате процесса ПОЛ образуются токсические для клеток растений продукты — альдегиды и 4-гидрокси-2,3-ноненили, ингибирующие ферменты, вовлеченные в фотодыхание и в цикл трикарбоновых кислот. Это оказывает влияние на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий за счет истощения пула НАДН в матриксе митохондрий. Более того, окисление активными формами кислорода SH-группы Cys-56 в АТФ/АДФ-антипортере может привести к открытию неспецифической поры (permeability transition pore) [4], что может вызвать нарушение осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. В результате этого возможно набухание митохондрий, выход цитохрома С и индукция апоптоза [5]. Мы предположили, что антиоксиданты, уменьшая генерацию АФК митохондриями и таким образом снижая интенсивность ПОЛ, могут повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов. В качестве объекта исследе-

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, ПОЛ — перекисное окисление липидов, БСА — бычий сывороточный альбумин, МЭЖК — метиловые эфиры жирных кислот.

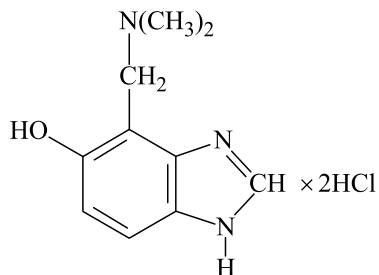


Рис. 1. Структурная формула амбиола (2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол-дигидрохлорида).

дования было выбрано производное 5-бензимидазола — амбиол (2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол-дигидрохлорид) (рис. 1).

Известно, что амбиол повышает устойчивость растений к абиотическим стрессорам. Он способствует выработке неспецифического иммунитета к грибным и бактериальным заболеваниям сельскохозяйственных культур и снижает содержание радионуклидов в продуктах растениеводства [6]. Повышая устойчивость растений к стрессовым факторам, амбиол, вероятно, влияет на функциональные характеристики митохондрий, поскольку эти органеллы играют одну из ведущих ролей в адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды [7]. В связи с этим исследовали влияние амбиола на биоэнергетические характеристики митохондрий растений, в частности митохондрий проростков гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях пятисуточных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Флора 2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01%-ным раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение часа замачивали в воде, а опытную группу — в 10^{-6} М растворе амбиола. Спустя час семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение суток в темноте при температуре 24°C . Затем половину проростков контрольной группы (при дефиците воды) и проростки, обработанные амбиолом, на двое суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через двое суток проростки обеих групп переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих двух суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение пяти суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Амбиол был синтезирован в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, схема

синтеза представлена на рис. 2. Номер регистрации (свидетельства) торговой марки «Амбиола»: 258534.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования [8]. Эпикотили гороха гомогенизировали в среде, содержащей: 0.4 М сахарозы, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиотреитола и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), свободного от жирных кислот. Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 8 мл среды и центрифугировали 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 сахарозы, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1% БСА и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфера (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 и 0.1% БСА. В качестве субстратов окисления использовали малат (10 мМ) + глутамат (10 мМ).

Уровень перекисного окисления липидов оценивали флуоресцентным методом [9]. 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 десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 360 нм, испускания — 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Исследование жирнокислотного состава мембран митохондрий проростков гороха проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Метилловые эфиры жирных кислот получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [10,11]. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе марки «Кристалл 2000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм; J&W Scientific, США). Анализ

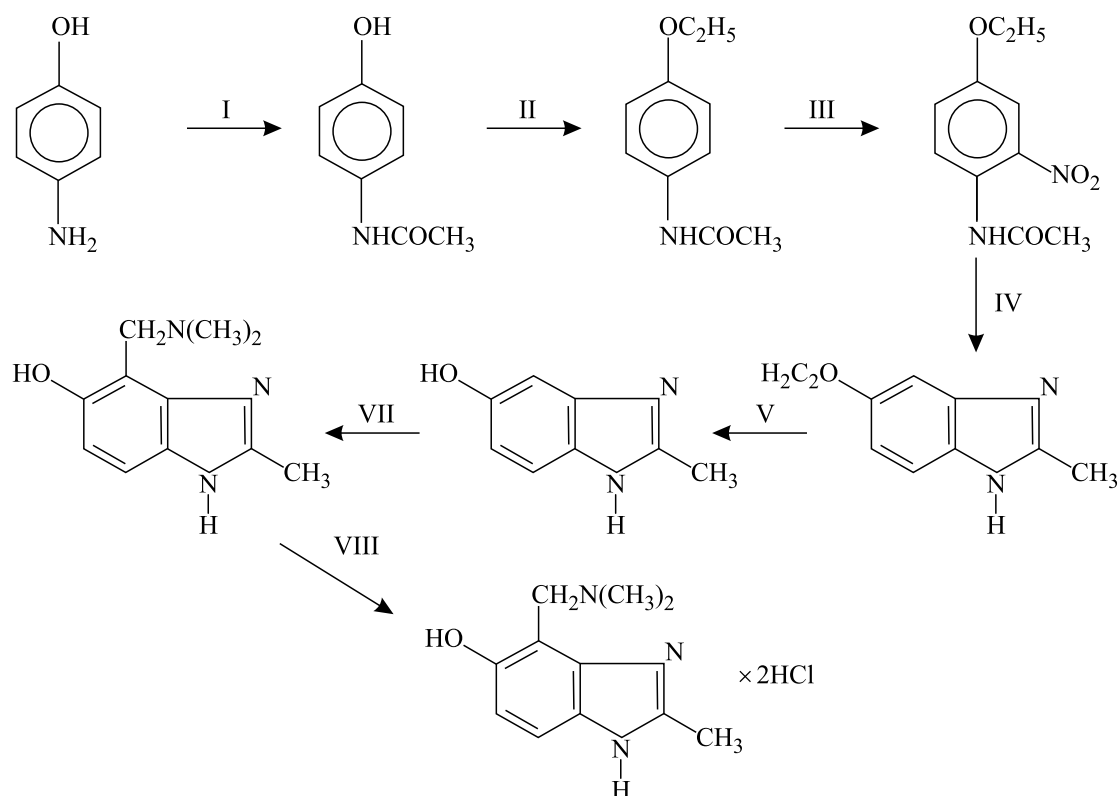


Рис. 2. Схема синтеза амбиола.

МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120°C 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 [12]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по соотношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение).

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных хроматографическому анализу, на приборе Hewlett Packard-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 дальтон.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 0.1 М KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ KH_2PO_4 , pH 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

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

Реактивы. В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол и хлороформ — Merck, Германия; сахароза, трис и KCl — Sigma, США; БСА (свободный от жирных кислот), FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон), малат, глутамат и HEPES — MP Biomedicals, Германия; дитиотреитол — Appli-Chem, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск концентраций амбиола, эффективно снижающих интенсивность ПОЛ, проводили, используя модель «старения» митохондрий проростков гороха. «Старение» приводило к активации ПОЛ в мембранах митохондрий, которое регистрировали по флуоресценции конечных продуктов перекисного окисления липидов (оснований Шиффа). При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий возрастала в 1.7 раза (рис. 3). Введение в среду инкубации ми-

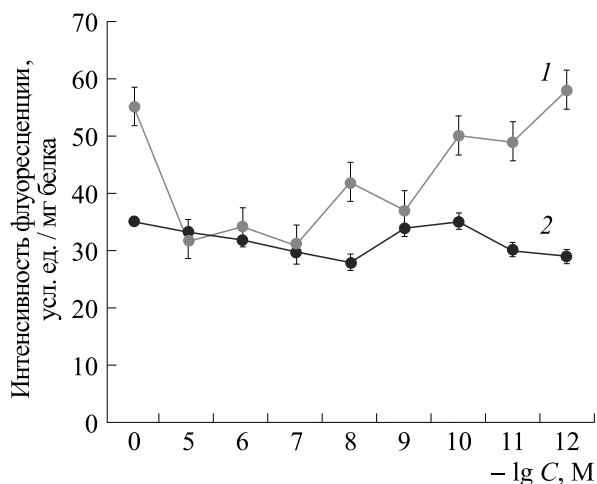


Рис. 3. Влияние «старения» и амбиола на интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий проростков гороха: кривая 1 — «старение» + амбиол, кривая 2 — контроль + амбиол. По оси ординат — интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс — концентрация амбиола.

тохондрий амбиола вызывало снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Этот эффект имел дозовую зависимость. Наиболее эффективными концентрациями являлись 10^{-5} – 10^{-6} М и 10^{-9} М. Можно предположить, что именно в этих концентрациях препарат будет проявлять антистрессовые свойства.

Поскольку процессы адаптации требуют значительных энергетических затрат [13], митохондрии играют одну из основных ролей в устойчивости организма к действию стрессовых факторов. В связи с этим исследовали влияние амбиола

на биоэнергетические характеристики митохондрий. Введение препарата в среду инкубации приводило к изменению энергетики митохондрий. При этом наиболее значительные изменения наблюдались в максимальных скоростях окисления НАД-зависимых субстратов: препарат в концентрации 10^{-5} – 10^{-6} М и 10^{-9} М в 1.4–1.5 раза повышал скорости окисления малата и глутамата в присутствии АДФ, а в присутствии FCCP — в 1.6–1.7 раза. Повышалась и эффективность окислительного фосфорилирования: величина дыхательного контроля по Чансу возрастала с 2.09 ± 0.06 до 2.83 ± 0.07 (10^{-6} М) и до 3.00 ± 0.10 (10^{-5} М) (табл. 1).

Именно в этих концентрациях препарат снижал до контрольных величин активированное «старением» перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий. Возможно, что регуляция метаболических процессов в растительной клетке амбиолом обусловлена изменением физико-химических свойств биологических мембран, а, следовательно, и активности связанных с ними ферментов.

Отметим, что часовая инкубация митохондрий с 10^{-6} М амбиола приводила к изменению жирно-кислотного состава мембран митохондрий. При этом наиболее сильные изменения происходили в содержании C_{18} жирных кислот. Так, содержание основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина (18:2 $\omega 6$ и 18:3 $\omega 3$), увеличилось на 14% и на 13% соответственно, а содержание 18:0 снизилось на 13.5% (рис. 4).

Отметим, что обработка проростков гороха 10^{-6} М амбиола стимулировало рост побегов гороха (рис. 5). При этом данный эффект оказался

Таблица 1. Влияние амбиола на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха (нг атом O_2 /мг белка·мин)

V_0	Амбиол, М	V_2	V_3	V_4	FCCP	V_3/V_4
15.0 ± 3.9 (10)	—	—	61.1 ± 7.6 (10)	30.4 ± 6.9 (10)	57.1 ± 5.5 (10)	2.09 ± 0.06 (10)
13.7 ± 2.3 (6)	10^{-5}	22.6 ± 2.5 (6)	90.0 ± 14.5 (6)	30.0 ± 8.2 (6)	95.5 ± 2.0 (6)	3.00 ± 0.10 (6)
19.8 ± 0.8 (7)	10^{-6}	27.9 ± 0.9 (7)	82.7 ± 10.4 (7)	29.3 ± 2.2 (7)	91.0 ± 3.5 (7)	2.83 ± 0.07 (7)
16.0 ± 0.9 (6)	10^{-7}	18.5 ± 0.4 (6)	58.1 ± 4.1 (6)	24.9 ± 1.0 (6)	60.8 ± 4.8 (6)	2.14 ± 0.02 (6)

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ $MgCl_2$, 0.1% БСА. Дополнительные добавки: 5 мМ малата, 10 мМ глутамата или 5 мМ сукцината, 125 мкМ АДФ, 0.5 мкМ FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона).

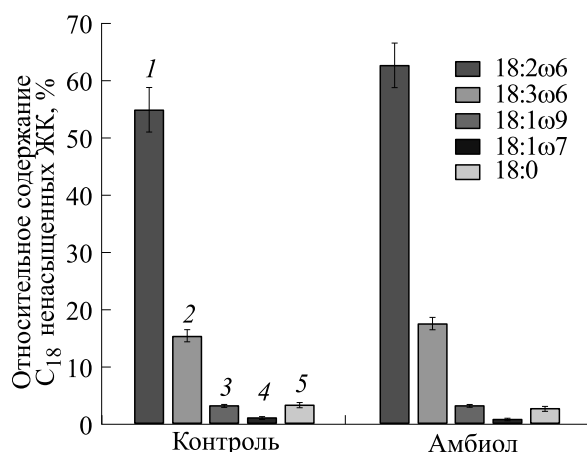


Рис. 4. Влияние амбиола на относительное содержание C_{18} жирных кислот (в %) в мембранах митохондрий проростков гороха: 1 – 18:2 ω 6, 2 – 18:3 ω 6, 3 – 18:1 ω 9, 4 – 18:1 ω 7, 5 – 18:0.

наиболее выраженным в условиях дефицита воды.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что амбиол в качестве регулятора роста растений проявляет протекторные свойства благодаря влиянию на функциональное состояние митохондрий. Он получил широкое применение в сельскохозяйственной практике. Препарат малотоксичен, не обладает мутагенными и канцерогенными свойствами [14]. Амбиол ускоряет прорастание и увеличивает всхожесть семян различных сельскохозяйственных культур. По мнению ряда авторов, ростостимулирующее влияние амбиола, вероятно, обусловлено тем, что

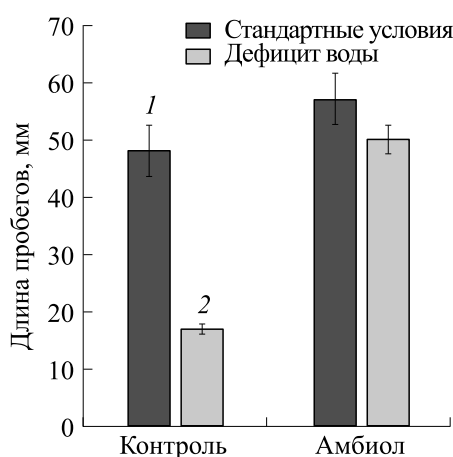


Рис. 5. Длина побегов пятидневных проростков гороха в условиях дефицита воды и обработки семян гороха амбиолом: 1 – стандартные условия; 2 – дефицит воды.

он активирует процесс набухания, предшествующий началу роста осевых органов семян, в частности семян кормовых бобов *Vicia faba minor*. Авторы предполагают, что этот эффект препарата связан с особенностями его действия на липидный метаболизм, а именно на липидные компоненты мембран, и с ускоренным по сравнению с контролем проникновением воды через семенные покровы, что приводит к более быстрому достижению критических уровней оводненности, запускающих процессы подготовки клеток к началу растяжения [15]. Под влиянием амбиола ускоряются темпы роста и повышается продуктивность растений, что может быть следствием увеличения количества цитокининов и ауксинов, а также усиления процесса фотофосфорилирования и интенсивности фотосинтеза [16]. И, наконец, на тканях картофеля показано, что препарат индуцировал дифференцировку пластид в сторону усложнения их внутренней мембранной структуры, что придавало пластидам способность к синтезу изопrenoидных и фенольных соединений, выполняющих важную роль в реакциях устойчивости к действию стрессовых факторов.

Полученные данные свидетельствуют, что антистрессовые и ростостимулирующие свойства препарата, возможно, определяются его влиянием на функциональное состояние митохондрий, играющих одну из важнейших ролей в устойчивости организма к изменяющимся условиям внешней среды.

ВЫВОДЫ

Мы предполагаем, что защитный эффект препарата, возможно, связан с влиянием амбиола на содержание линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий. Рост их содержания в мембранах этих органелл, по-видимому, свидетельствует об увеличении содержания кардиолипина в мембранах митохондрий [17], что влечет за собой увеличение эффективности работы дыхательной цепи и, следовательно, активации энергетического метаболизма растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (номер темы, государственная регистрация 44.4-1201253310).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farooq M. A., Niazi A. K., Akhtar J., Saifullah, M. Farooq, Soury Z., Karimi N., and Rengel Z. *Plant Physiol. Biochem.*, **141**, 353–369 (2019). DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039
2. Шиков А. Е., Чиркова Т. В. и Емельянов В. В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экологическая генетика*, **19** (4), 343–363 (2021). DOI: 10.17816/ecogen75975
3. Колупаев Ю. Е. и Карпец Ю. В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений. *Укр. биохим. журн.*, **86** (4), 18–35 (2014).
4. Благонравов М. Л., Азова М. М. и Фролов В. А. *Программированная клеточная гибель в патологии сердца* («Литтерра», М., 2013).
5. Новодережкина Е. А., Животовский Б. Д. и Гогвадзе В. Г. Индукция неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны и ее роль в гибели клеток. *Молекуляр. биология*, **50** (1), 51–68 (2016). DOI: 10.7868/S002689841601016X
6. Кирсанова Е. В. и Кириллова И. Г. Влияние препарата амбиол на продукционный процесс гороха и картофеля. *Вестн. ОрелГАУ*, № 4 (7), 7–9 (2007).
7. Войников В. К. *Митохондрии растений при температурном стрессе* («Гео», Новосибирск, 2011).
8. Попов В. Н., Рууге Э. К. и Старков А. А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*, **68** (7), 910–916 (2003).
9. Fletcher B. I., Dillard C. D., and Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, **52** (1), 1–9 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8
10. Carreau J. P. and Dubacq J. P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, **151** (3), 384–390 (1979) DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
11. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., and Sim J. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. *Poultry Sci.*, **79** (8), 1168–1171 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
12. Golovina R. V. and Kuzmenko T. E. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on their retention indices. *Chromatographia*, **10** (9), 545–548 (1977). DOI: 10.1007/BF02262915
13. Шакирова Ф. М. *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция* («Гилем», Уфа, 2001).
14. Пальченко А. К., Пальченко С. А. и Сторожишина К. М. Влияние стимуляторов роста на биометрические показатели сеянцев сосны обыкновенной. *Лесное хозяйство*, № 2, 297–301 (2008).
15. Дубинская Н. И. и Обручева Н. В. в сб. *Физиология семян: формирование, прорастание, прикладные аспекты*. Отв. ред. Х. Х. Каримов («Дониш», Душанбе, 1990), сс. 181–183.
16. Евсюнина А. С. *Влияние эпибрасинолида и амбиола на гормональный баланс и ультраструктуру тканей растений картофеля при регуляции ростовых процессов в онтогенезе*. Дис. ... канд. биол. наук (Институт биохимии им. А.Н. Баха, М., 2006).
17. Zhou Y., Peisker H., and Dörmann P. Molecular species composition of plant cardiolipin determined by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, **57** (7), 1308–1321 (2016). DOI: 10.1194/jlr.D068429

Ambiol Modulates the Functional Characteristics of Pea Seedlings Mitochondria

I.V. Zhigacheva*, N.I. Krikunova*, Yu.V. Kuznetsov*, and A.N. Goloshchapov*

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

The effect of ambiol, a plant growth regulator, on the functional state of mitochondria of etiolated pea seedlings has been studied. The drug prevented the activation of lipid peroxidation in mitochondrial membranes in the concentration range of 10^{-5} – 10^{-6} and 10^{-9} M. The addition of ambiol to the incubation medium of these organelles led to an increase in the oxidation rates of NAD-dependent substrates. At the same time, the most effective concentrations were 10^{-5} and 10^{-6} M. Changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria were accompanied by alterations in the fatty acid composition of mitochondrial membranes. The most significant changes were observed in the content of 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 fatty acids. It is assumed that an increase in the content of these fatty acids in the mitochondrial membranes may indicate an increase in the content of cardiolipin, which provides the effective functioning of the mitochondrial respiratory chain, and, consequently, plays an essential role in the maintenance of high-energy-level metabolism. Treatment of pea seeds with ambiol not only prevented a decrease in the growth rate of pea seedlings under water-deficit conditions, but also stimulated their growth.

Keywords: mitochondria, plant growth regulators, lipid peroxidation, fatty acids, water deficit