

УДК 577.352.336

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАТРИЙ- μ 2-ДИТИОСУЛЬФАТОТЕТРАНИТРОЗИЛДИФЕРАТ ТЕТРАГИДРАТА НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИКОТИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2024 г. Н.Ю. Герасимов^{*,#}, О.В. Неврова^{*}, И.В. Жигачева^{*}, Н.И. Крикунова^{*}, А.К. Воробьева^{*}, И.П. Генерозова^{**}, А.Н. Голощапов^{*}

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

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

[#]E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Оксид азота является сигнальной молекулой растений в стрессовых условиях, также эта молекула может обладать токсичным действием. В работе проведено исследование дозозависимого действия донора оксида азота натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрата на структурное состояние мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха. При обработке митохондрий данным препаратом в концентрации 10^{-8} М наблюдались термоиндуцированные структурные переходы при температурах от 15°C до 21°C и от 30°C до 36°C в липидных областях и при температурах от 12°C до 15°C и от 27°C до 33°C – в приобластных областях мембран. В липидных областях мембран препарат проявлял антиоксидантные свойства, приводя к накоплению содержания длинных ненасыщенных жирных кислот. Обработка митохондрий натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидратом в дозе 10^{-4} М, по-видимому, приводила к значительному увеличению уровня пероксидного окисления липидов и текучести липидной фазы мембран.

Ключевые слова: структура мембран, митохондрии, микровязкость мембран, проростки гороха, донор оксида азота, ТНКЖ-тио.

DOI: 10.31857/S0006302924020093, EDN: OUFFMQ

Митохондрии являются энергетическим центром клетки, поэтому имеют важное значение во многих клеточных процессах. Митохондрии играют ключевую роль в ответе на внешние стресс-факторы, а также выступают в качестве центральных органелл в процессах апоптоза. Кроме того, значительное количество активных форм кислорода производится на мембранах митохондрий в процессах окислительного фосфорилирования. В свою очередь, выработка большого количества активных форм кислорода может приводить к увеличению уровня пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и окислительному стрессу. Уровень ПОЛ в мембранах значительно влияет на структуру и состав мембран [1, 2]. Нарушения в структуре

и составе липидов мембран могут приводить к дисфункции мембранных белков и ферментов [3].

Донор оксида азота натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрата (ТНКЖ-тио) способен защищать растения от теплового шока путем предотвращения дисфункции митохондрий [4]. ТНКЖ-тио генерирует NO и частицы $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$ [5]. Оксид азота (II) и ионы железа могут обладать не только полезным, но и токсичным действием [6–8], поэтому необходимо изучить действие ТНКЖ-тио в норме.

Поэтому целью исследования было изучение действия ТНКЖ-тио на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, вне стрессовых условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТНКЖ-тио – кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий- μ 2-дитиосульфа-

Сокращения: ПОЛ – пероксидное окисление липидов, ТНКЖ-тио – серанитрозильный комплекс железа с тиосульфатом, натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат.

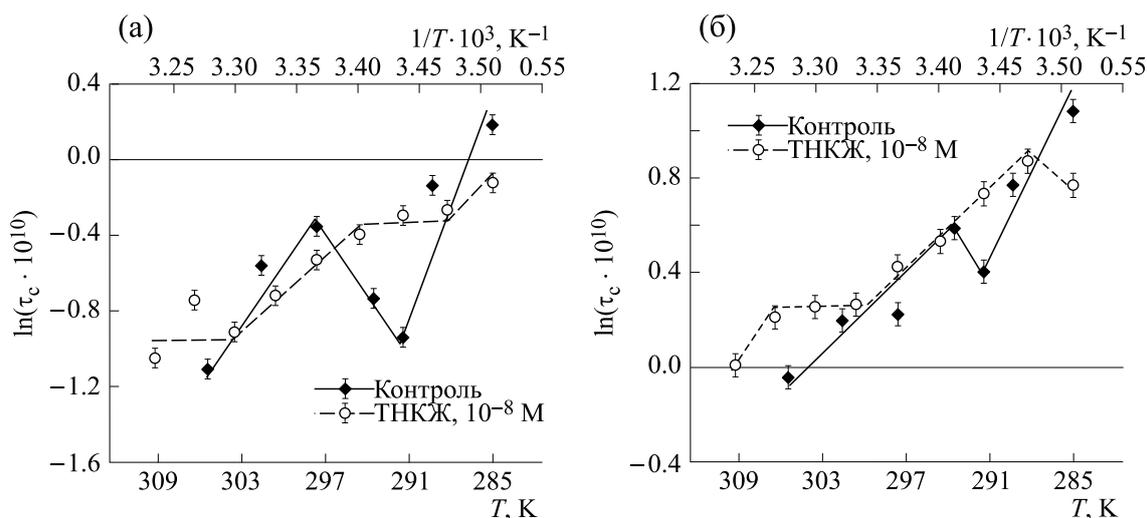


Рис. 2. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии после обработки семян гороха ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М: (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

Для контрольной группы наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от 18°C до 20°C (291–293 К) в приобелковых областях (рис. 2б, 3б) и при температурах от 18°C до 24°C (291–297 К) в липидных областях мембран (рис. 2а, 3а). Данную низкотемпературную структурную перестройку связывают с переходом липидного бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние [13, 14], т.е. при температурах выше этих перестроек (>293 К для приобелковых и >297 К для липидных областей) мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии.

В митохондриях эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных ТНКЖ-тио в дозе 10^{-8} М, наблюдались по два термоиндуцированных структурных перехода при температурах от 15°C до 21°C (288–294 К) и от 30°C до 36°C (303–309 К) в липидных областях (рис. 2а) и при температурах от 12°C до 15°C (285–288 К) и от 27°C до 33°C (300–306 К) в приобелковых (рис. 2б) областях мембран. Низкотемпературный переход является переходом «кристалл – жидкий кристалл» [13, 14] и для приобелковых областей мембран лежит в интервале температур ниже (на 6 К), чем соответствующий переход для контроля (рис. 2б). Следовательно, ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М сдвигал термоиндуцированные структурные переходы в приобелковых областях мембран митохондрий в сторону более низких температур. Подобный сдвиг, но в меньшей степени (на 3 К), наблюдался также и в липидных областях мембран (рис. 2а). Сдвиг структурных переходов «кристалл–жидкий кристалл» в область более низких температур указывает на увеличение «жидкости» мембран (уменьшение

кристалличности). Высокотемпературные структурные переходы в мембранах связывают с изменениями структуры мембранных белков [14]. Появление структурных перестроек в приобелковых областях мембран (рис. 2б) в температурном интервале от 27°C до 33°C (300–306 К), по-видимому, связано со сдвигом соответствующих высокотемпературных перестроек для опытной группы относительно контрольной в сторону более низких температур. Наиболее вероятно, что высокотемпературные структурные перестройки для контрольной группы находились за пределами исследованного интервала >305 К. Вслед за перестройками в приобелковых областях происходила перестройка и в липидной фазе мембран при температурах от 30°C до 36°C (303–309 К) более низких, чем для контроля. В работе [15] было показано, что в присутствии ТНКЖ-тио в дозе 10^{-8} М происходило умеренное разобщение в электрон-транспортной цепи митохондрий, что, по-видимому, приводило к нагреву системы вследствие выделения части энергии электрон-транспортной цепи в виде тепла [16]. В результате локальная температура увеличивалась, что, вероятно, и приводило к сдвигу всех наблюдаемых нами термоиндуцированных переходов в область более низких температур. Приобелковые области разогревались сильнее, так как именно здесь происходило выделение тепла, поэтому переходы сдвигались сильнее, чем в липидных областях.

Наиболее эффективным температурным интервалом для вегетационного периода у гороха является интервал от 22°C до 34.5°C (от 294 К до 307.5 К) [17]. При температурах выше 24°C (297 К) как липидные, так и приобелковые области мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха контрольной группы находились в жидкокри-

сталлическом состоянии. По-видимому, жидкокристаллическое состояние мембран важно для функционирования клеток растений. Для опытной группы (10^{-8} М ТНКЖ-тио, рис. 2) жидкокристаллическое состояние липидных областей мембран соответствует участку температур от 21°C до 30°C (294–303 К), а при белковых – от 15°C до 27°C (288–300 К).

В липидных областях мембран (рис. 2а) график зависимости $\ln(\tau_c)$ от $1/T$ на участке температур от 21°C до 30°C для опытного образца лежал ниже, чем для контрольного при температурах больше 24°C (297 К). Следовательно, обработка семян ТНКЖ-тио в дозе 10^{-8} М приводила к уменьшению микровязкости жидкокристаллического состояния липидных областей мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха. По-видимому, высвободившийся из ТНКЖ-тио оксид азота (II) в данном случае приводил к увеличению общего содержания всех длинных ненасыщенных жирных кислот (НЖК) C_{20} (табл. 1). Накопление липидов с НЖК, в свою очередь, приводило к увеличению текучести липидной фазы бислоя (рис. 2а) относительно контроля. Поскольку происходит накопление НЖК, это означает, что в липидных областях мембран оксид азота проявлял антиоксидантные свойства. В то же время микровязкость жидкокристаллического состояния при белковых областях мембран опытной группы совпадала с микровязкостью контроля (рис. 2б), о чем свидетельствует совпадение соответствующих уравнений прямых $\ln(\tau_c) = -14.4 + 4.4 \cdot 1/T$. При этом ТНКЖ-тио в дозе 10^{-8} М также уменьшал кристалличность при белковых областях мембран митохондрий, о чем свидетельствует сдвиг низкотемпературного термоиндуцированного перехода в область более низких температур (рис. 2б). Это, по-видимому, связано со значительным уменьшением содержания линолевой кислоты 18:2 (табл. 1), входящей в состав кардиолипина, который локализуется в основном возле белков дыхательной цепи [18]. Уменьшение количества линолевой кислоты могло происходить двумя путями. Во-первых, в при белковых областях, где концентрация активных форм кислорода значительно выше, так как эти формы генерируются при окислительном фосфорилировании на белках и ферментах митохондриальной мембраны, NO может взаимодействовать с супероксид-анион радикалом с образованием пероксинитрита [5]:

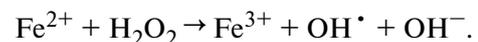


Пероксинитрит способен инициировать пероксидное окисление липидов при белковых областях мембран, что могло приводить к уменьшению содержания линолевой кислоты 18:2

(табл. 1). Во-вторых, уменьшение содержания линолевой кислоты могло быть связано с ее участием в качестве субстрата в процессах окисления [19]. При окислении линолевой кислоты задействуются все компоненты дыхательной цепи, как фосфорилирующие, так и нефосфорилирующие [19]. К последним относится, например, разобщающий белок альтернативная цианидрезистентная оксидаза, функционирование которой приводит к диссипации энергии и выделению тепла [20]. Выделение тепла, в свою очередь, могло привести к увеличению эффективной температуры ближайшего окружения митохондрий и, как следствие, к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов мембран в область более низких температур (рис. 2б).

На рис. 3 показаны графики зависимости $\ln(\tau_c)$ от $1/T$ зондов I и II в мембранах митохондрий эпикотилей проростков гороха после обработки семян ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М. В при белковых областях мембран наблюдалась термоиндуцированная структурная перестройка при температурах от 21°C до 27°C (294–300 К) (рис. 3б). ТНКЖ-тио в дозе 10^{-4} М на всем исследованном температурном интервале приводил к резкому уменьшению микровязкости липидной фазы митохондриальных мембран, которая не зависела от температуры (рис. 3а). Такое низкое значение микровязкости соответствует жидкому, а не жидкокристаллическому состоянию липидного бислоя, и характерно, например, для животных с патологией [21]. Это могло быть вызвано несколькими сценариями. Первый сценарий связан со сдвигом термоиндуцированных структурных переходов в область более низких температур, а второй – с разрушением митохондрий.

Согласно первому сценарию, оксид азота (II), как показано выше, может участвовать в пероксидном окислении липидов и тем самым проявлять прооксидантные свойства. Кроме того, высокая концентрация железа, содержащегося в ТНКЖ-тио, может ускорять ПОЛ путем образования гидроксильного радикала в реакции Фентона:



Таким образом, ТНКЖ-тио в большой концентрации (10^{-4} М), по-видимому, приводил к значительному увеличению уровня ПОЛ. Затем окислительный стресс, вероятно, приводил к набуханию митохондрий [22]. Вследствие этого увеличилась текучесть липидной фазы мембран из-за уменьшения плотности упаковки липидов (рис. 3а). Кроме того, из-за высокого уровня ПОЛ, по-видимому, практически полностью окислялись липиды с длинными жирнокислотными хвостами 20:1 и 20:3 и накапливались более

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

Название	Контроль	ТНКЖ 10^{-4}	ТНКЖ 10^{-8}
14:0	0.67 ± 0.30	0.96 ± 0.20	0.91 ± 0.22
16:1 ω 7	0.90 ± 0.12	1.31 ± 0.09	1.13 ± 0.11
16:0	16.16 ± 0.5	22.00 ± 1.00	15.82 ± 0.80
17:0	2.14 ± 0.07	3.00 ± 0.10	1.37 ± 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	0.60 ± 0.01	1.2 ± 0.01
18:0	3.00 ± 0.21	4.50 ± 0.18	7.40 ± 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
Длинные (18-20)	80 ± 2	73 ± 2	81 ± 2
Короткие (<18)	20 ± 2	27 ± 2	19 ± 2
Насыщенные	23 ± 2	31 ± 2	28 ± 2
Ненасыщенные	77 ± 2	69 ± 2	72 ± 2

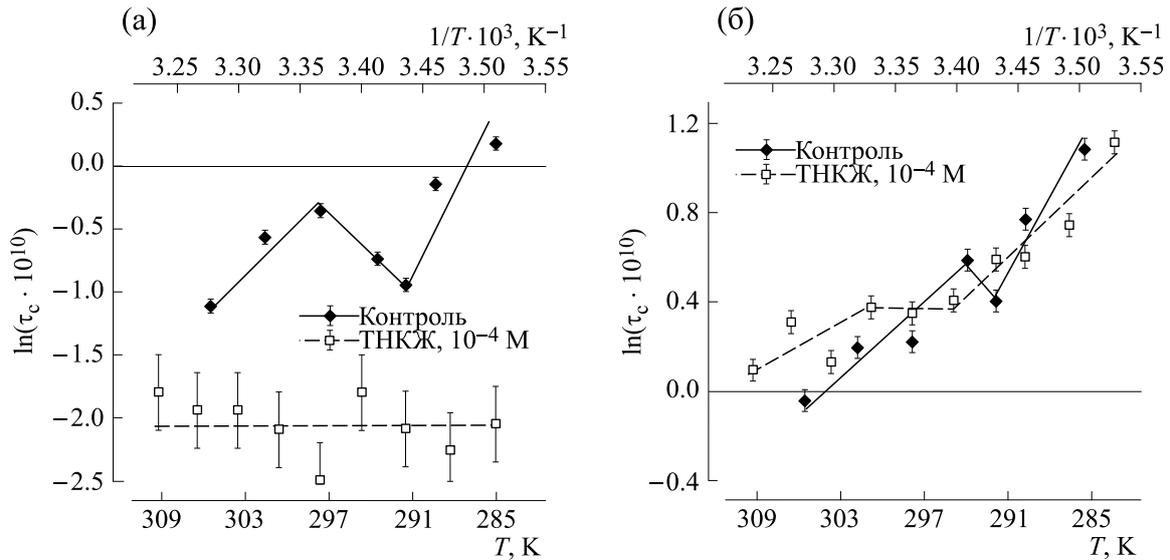


Рис. 3. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии после обработки семян гороха ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М: (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

короткие липиды с НЖК 14:0, 16:0, 16:1, 17:0 (табл. 1), что приводило к еще большему уменьшению микровязкости липидной фазы мембран. В этом случае структура приобелковых областей мембран, по-видимому, сохранялась (рис. 3б) за счет деструкции липидной фазы из-за миграции липидов. Таким образом, вероятно, большая концентрация 10^{-4} М ТНКЖ-тио сдвигала низкотемпературные термоиндуцированные структурные переходы обеих фаз мембран в область более низких температур сильнее, чем доза 10^{-8} М, за пределы исследуемого интервала ($<10^\circ\text{C}$), и в приобелковых областях мембран жидкокристаллическому состоянию соответствует температурный интервал от 10°C до 21°C (294–300 К) (рис. 3б).

По второму сценарию слишком большая концентрация NO , высвобождающегося из ТНКЖ-тио, могла привести к разрыву наружной мембраны митохондрий [23] вплоть до разрушения митохондрий, вследствие чего зонд I мог локализоваться преимущественно в среде выделения, микровязкость которой значительно ниже микровязкости мембран, поэтому значения τ_c были слишком низкими (рис. 3а). При таком сценарии разрушения мембран зонд II локализовался в отдельных липидных рафтах [24] трансмембранных белков, находящихся вне мембран. Из-за гидрофобных взаимодействий липидные рафты, находясь вне мембраны, образовывали более жесткую структуру, чем в составе мембран. Это могло привести к увеличению кристалличности приобелковых областей липидного бислоя и, следовательно, к сдвигу термоиндуцированного структурного

перехода «кристалл–жидкий кристалл» в сторону более высоких температур (рис. 3б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М приводил к сдвигу термоиндуцированных структурных перестроек в область более низких температур, при этом снижал микровязкость липидной фазы мембран. ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М может приводить к деструкции липидной фазы мембран митохондрий, вплоть до разрушения мембран. Таким образом, при использовании данного препарата в качестве защиты от неблагоприятных факторов следует тщательно подбирать концентрацию ТНКЖ-тио.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 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. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б., Гвахария В. О. и Глущенко Н. Н. Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концентрации антиоксидантов в составе липидов клеточных мембран. *ДАН СССР*, **228** (1), 215–218 (1976).
2. Бурлакова Е. Б. и Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. *Успехи химии*, **54** (9), 1540–1558 (1985). DOI: 10.1070/RC1985v054n09ABEH003121
3. Horvath S. E. and Daum G. Lipids of mitochondria. *Progr. Lipid Res.*, **52** (4), 590–614 (2013). DOI: 10.1016/j.plipres.2013.07.002
4. Жигачева И. В., Бинюков В. И., Генерозова И. П., Миль Е. М., Крикунова Н. И., Расулов М. М. и Албантова А. А. Натрий- μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат предотвращает обусловленную тепловым шоком дисфункцию митохондрий. *Физиология растений*, **69** (2), 198–206 (2022). DOI: 10.31857/S0015330322010225
5. Санина Н. А. и Алдошин С. М. Строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами. *Изв. РАН. Сер. хим.*, **7**, 1199–1227 (2011). DOI: 10.1007/s11172-011-0192-x
6. Barone M. C., Darley-Usmar V. M., and Brookes P. S. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **278** (30), 27520–27524 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M304129200
7. Иванищев В. В. Доступность железа в почве и его влияние на рост и развитие растений. *Изв. ТулГУ. Естественные науки*, № 3, 127–138 (2019).
8. Blokhina O. and Fagerstedt K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, **138** (4), 447–462 (2010). DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x
9. Бинюков В. И., Борунова С. Ф., Гольдфельд М. Г., Жукова И. Г., Кудлай Д. Г., Кузнецов А. Н., Шапиро А. Б. и Островский Д. Н. Исследование структурных переходов в биологических мембранах методом спинового зонда. *Биохимия*, **36** (6), 1149–1155 (1971).
10. Вассерман А. М., Бучаченко А. Л., Коварский А. Л. и Нейман М. Б. Исследование молекулярных движений в полимерах методом парамагнитного зонда. *Высокомолекуляр. соединения*, **10A** (8), 1930–1936 (1968).
11. Кузнецов А. Н. *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
12. Кухлинг Х. *Справочник по физике* (Мир, М., 1983).
13. Комов В. П. и Шведова В. Н., *Биохимия: учебник для вузов* (Юрайт, М., 2021).
14. Гендель Л. Я., Гольдфельд М. Г., Кольтовер В. К., Розанцев Э. Г. и Сускина В. И. Исследование конформационных переходов в биомембранах методом слабо связанного парамагнитного зонда. *Биофизика*, **13** (6), 1114–1116 (1968).
15. Жигачева И. В., Крикунова Н. И., Генерозова И. П., Буцанец П. А., Герасимов Н. Ю., Неврова О. В., Васильев С. В. и Голошапов А. Н. Натрий- μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрат повышает эффективность работы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха. *Биофизика*, **67** (4), 671–679 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922040056
16. Seymour R. S. Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. *Biosci. Rep.*, **21** (2), 223–236 (2001). DOI: 10.1023/a:1013608627084
17. Макашева Р. Х. *Горох* (Колос, Лен., 1973).
18. Kurz C. R., Kissner R., Nauser T., Perrin D., and Koppenol W. H. Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Rad. Biol. Med.*, **35** (12), 1529–1537 (2003). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.012
19. Грабельных О. И., Побежимова Т. П., Колесниченко А. В., Сумина О. Н., Пивоварова Н. Ю. и Войников В. К. Изучение возможности свободных жирных кислот выступать в качестве субстрата окисления в митохондриях озимой пшеницы. *Вестн. ХНАУ. Сер. биол.*, **5** (3), 7–15 (2003).
20. Grabelnych O. I. The energetic functions of plant mitochondria under stress. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **1** (1), 37–54 (2005).
21. Голошапов А. Н. и Бурлакова Е. Б. Исследование термоиндуцированных структурных переходов в мембранах органов животных при введении им антиоксидантов и злокачественном росте. *Биофизика*, **25** (1), 97–101 (1980).
22. Сергеев О. С., Уксусова Л. И., Сапрыкин В. В., Денисова Е. А. и Прохоренко И. О. *Типовые патологические процессы. Воспаление. Лихорадка. Повреждение клетки* (СамГМУ, Самара, 2004).
23. Casolo V., Petrusa E., Krajňáková J., Macri F., and Vianello A. Involvement of the mitochondrial KATP+ channel in H₂O₂-or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, **56** (413), 997–1006 (2005). DOI: 10.1093/jxb/eri093
24. Геннис Р. *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).

Study of the Effect of Sodium- μ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate on the Structure of Mitochondrial Membranes Isolated from Epicotyls of Pea Seedlings

N.Yu. Gerasimov*, O.V. Nevrova*, I.V. Zhigacheva*, N.I. Krikunova*, A.K. Vorobyova*,
I.P. Generozova**, and A.N. Goloshchapov*

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

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

Nitric oxide is a signaling molecule of plants under stressful conditions, and also this molecule can have a toxic effect. This study focused on investigation of a dose-dependent effect of the nitric oxide donor, sodium- μ 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate, on the structural state of mitochondrial membranes of epicotyls of pea seedlings. Treatment of mitochondria with 10^{-8} M of this drug led to thermo-induced structural transitions within the temperature range from 15°C to 21°C and from 30°C to 36°C in the lipid regions, and within the temperature range from 12°C to 15°C and from 27°C to 33°C in preprotein regions of membranes. In the lipid regions of the membranes, the compound exhibited antioxidant activity, leading to accumulation of long unsaturated fatty acids. Treatment of mitochondria with 10^{-4} M sodium- μ 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate most likely led to a significant increase of the lipid peroxidation level and membrane lipid phase fluidity.

Keywords: membrane structure, mitochondria, membrane microviscosity, pea seedlings, nitric oxide donor, TNIC-thio