

ЭФФЕКТ СВЕРХМАЛЫХ ДОЗ АНТИОКСИДАНТА РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕПЛОВОГО СТРЕСС-ФАКТОРА НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА *Pisum sativum* L.

© 2023 г. Н. Ю. Герасимов^{1*}, О. В. Неврова¹, И. В. Жигачева¹,
И. П. Генерозова², А. Н. Голощапов¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 29.12.2021;

после доработки 17.04.2022;

принята в печать 20.04.2022

Изучено действие растительного антиоксиданта ресвератрола на структуру мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха *Pisum sativum* L., подвергнутых воздействию теплового стресс-фактора. В качестве структурных характеристик мембран использовали температурную зависимость микровязкости. Микровязкость определяли методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов. Тепловой шок приводил к уменьшению кристалличности мембран митохондрий. Показано, что сверхмалые дозы ресвератрола возвращают структуру липидного бислоя митохондрий после воздействия теплового шока до состояния, свойственного нативным растениям.

Ключевые слова: структура мембран, микровязкость мембран, антиоксидант, ресвератрол, сверхмалые дозы, тепловой шок, стресс-фактор, абиотический стресс, митохондрии, проростки гороха, пероксидное окисление липидов.

DOI: 10.31857/S0207401X23010041, EDN: MOUZSB

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, растения в природе подвергаются воздействиям многих биотических и абиотических факторов. Тепловой шок (ТШ) является одним из наиболее распространенных абиотических стрессовых факторов. Высокая температура может не только задерживать рост всего растения, листьев, корней, но и прорастание семян, а также скорость роста проростков. В ответ на действие любого стресс-фактора резко возрастают синтез и активность белков теплового шока (БТШ) [1]. Последние (БТШ) в клетке, подвергнутой стрессу, интенсивно связываются с белками, препятствуя их денатурации, и поддерживают поврежденные белки в состоянии, способном к последующему восстановлению [2–4], а также участвуют в процессах транспортировки белковых молекул через мембраны митохондрий и ядерную оболочку [5]. Изменение структуры мембранных белков часто приводит к изменению структуры липидного бислоя [6, 7]. Таким образом, тепловой шок, как и любой другой стресс-фактор, может влиять на структуру мембран митохондрий как напрямую, так и через воздействие БТШ.

Природный антиоксидант ресвератрол синтезируется в качестве защиты от биотических факторов, таких как паразитическое действие бактерий и грибов, а также от абиотических факторов, таких как окислительный стресс [8]. Ресвератрол как полифенольное соединение может оказывать непосредственное влияние на структуру и функцию митохондрий [9]. Растительные полифенолы взаимодействуют с белками, такими как сигнальные киназы, факторы транскрипции и ионные каналы [6], и регулируют окислительно-восстановительные процессы, аналогичные митохондриальным. На уровень пероксидного окисления липидов (ПОЛ) значительно влияют стресс-факторы, в результате чего могут изменяться структурные характеристики мембран, одной из которых является микровязкость [10, 11]. Действие антиоксидантов также приводит к изменению микровязкости мембран через систему регуляции пероксидного окисления липидов [12–14].

Таким образом, целью нашей работы было исследование влияния ресвератрола на структурные характеристики мембран митохондрий, выделен-

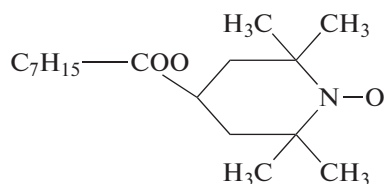
ных из проростков гороха, подвергнутого тепловому шоку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

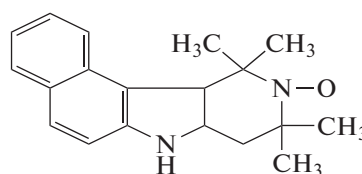
Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Флора 2. Семена гороха перед проращиванием промывали мыльной водой (хозяйственное мыло) и 0.01%-ным раствором KMnO_4 , а затем тщательно промывали дистиллированной водой в течение 2 мин. Проростки на 2 ч помещали в термостат при температуре 47°C на влажной фильтровальной бумаге. Для поддержания влажности в термостате находились две чашки Петри с водой. Спустя 2 ч выделяли митохондрии из проростков гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере, описанным

в работе [15]. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг белка на 1 мл суспензии митохондрий. Ресвератрол готовили последовательным разбавлением в среде выделения так, чтобы концентрации в образцах с митохондриями при конечном разбавлении составляли $5 \cdot 10^{-6}$ М и $5 \cdot 10^{-14}$ М.

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зондов использовали стабильные нитро-сильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил (зонд II):



Зонд I



Зонд II

В работе [16] показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II — в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I “липидным”, а зонд II — “белковым”.

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \Delta H_+ \times [(I_+/I_-)^{0.5} - 1]$, приведенной в работе [17]. Регистрацию спектров ЭПР проводили в диапазоне температур 285–305 К ($10\text{--}32^\circ\text{C}$) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы “Bruker”.

Известное соотношение Стокса—Энштейна (см., например, [18]) связывает параметр τ_c и вязкость среды, окружающей зонд $\tau_c = \eta V/kT$, где V — объем радикала (его можно считать прямо пропорциональным молекулярному весу), η — динамическая вязкость среды, k — постоянная Больцмана и T — абсолютная температура. Динамическая вязкость η связана с температурой следующим эмпирическим соотношением: $\eta = A'e^{b/T}$ [19], откуда следует $\ln \tau_c = A'' + b/T + \ln(1/T)$, где A' , A'' , b — константы. Исследуемый нами температурный

интервал (от 285 до 305 К) достаточно узок, и на его протяжении $\ln(1/T)$ меняется очень незначительно по сравнению со слагаемым b/T , поэтому можно считать $\ln \tau_c = a + b/T$.

Исходя из этой точки зрения, график зависимости $\ln \tau_c$ от $1/T$ для таких структур должен представлять собой ломаную, точки излома которой являются точками структурных переходов [20]. Наклон этих прямых позволяет определить энергию активации перехода $E_a = bR$ [21], где b — угловой коэффициент наклона соответствующего прямого участка, а R — универсальная газовая постоянная. Энергия активации соответствует энергии перестройки одного моля липидов мембран [21].

Статистическая обработка данных осуществлялась методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Office Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было изучено изменение структуры мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха *Pisum sativum* L., после воздействия на них теплового шока по сравнению с нативными растениями (контроль). Термоиндуцированные структурные переходы в приобластных областях

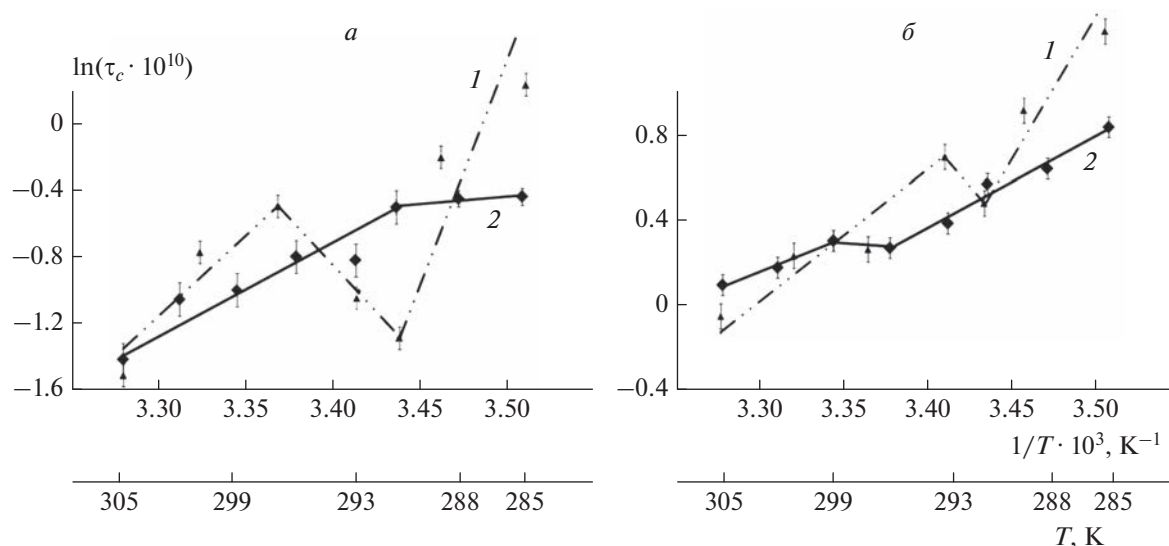


Рис. 1. Температурная зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха *Pisum sativum* L., в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана еще и T): 1 – для контрольной группы, 2 – после воздействия теплового шока; а – “липидный” зонд, б – “белковый” зонд.

мембран митохондрий (рис. 1б) наблюдались при температурах от 23 до 26°C (296–299 К), тогда как в контрольной группе – при температурах от 18 до 20°C (291–293 К). При температурах свыше 26°C (>299 К) зависимость $\ln \tau_c$ от $1/T$ для прибелковых областей после воздействия теплового шока лежала выше и имела меньший угол наклона, чем для нативных растений (рис. 1б). То есть с ростом температуры наблюдалась тенденция к увеличению микровязкости после воздействия ТШ по сравнению с нативными растениями.

Графики зависимостей времен вращательной корреляции от температуры для липидной и прибелковой фаз мембран митохондрий после воздействия ТШ в областях температур, меньших 299 К, лежат ниже, чем для нативных растений (рис. 1). Поэтому можно предположить, что в данном диапазоне температур ТШ приводит к увеличению текучести как прибелковой, так и липидной фазы мембран. При этом структурный переход в липидной фазе сдвигается в область более низких температур (рис. 1а): 12–18°C (285–291 К), относительно контроля. Данную структурную перестройку связывают с переходом липидного бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние [22, 23]. Сдвиг структурной перестройки в область более низких температур на фоне повышенной текучести указывает на увеличение “жидкости” мембран (уменьшение кристалличности). Вследствие уменьшения кристалличности липидного бислоя растет подвижность липидных молекул [22] и падает способность мембраны сохранять определенную упорядоченность, структурность.

Это, в свою очередь, может приводить к нарушению функций мембранных белков и ферментов, что неблагоприятно скажется на функционировании митохондрий в целом. Температура фазового перехода и текучесть мембран существенно зависят как от длины углеводородных цепей, наличия и положения двойных связей [23, 24], так и от плотности упаковки липидов в бислой. Тепловой шок может приводить к увеличению размеров митохондрий, а также к уменьшению индекса ненасыщенности жирных кислот из-за увеличения уровня пероксидного окисления липидов [25]. В нашем случае вследствие увеличения размеров митохондрий увеличивалась площадь поверхности мембран, что приводило, по-видимому, к уменьшению плотности упаковки липидов и, следовательно, к увеличению текучести липидного бислоя (рис. 1), несмотря на уменьшение соотношения ненасыщенных к насыщенным жирным кислотам [25]. Затем вырабатываемые при тепловом шоке БТШ изменяли структуру мембранных белков, что, вероятно, приводило к консолидации липидов вокруг белков и ферментов за счет миграции липидов из липидной фазы. В результате этого увеличивалась микровязкость прибелковых областей мембран по сравнению с нативными растениями при температурах свыше 299 К. Вероятно, благодаря таким структурным перестройкам мембраны возможно нормальное функционирование митохондрий при высоких температурах.

Тепловой шок приводит к увеличению уровня пероксидного окисления липидов в мембране [25–27], поэтому было интересным исследовать действие антиоксиданта ресвератрола на структуру мембран митохондрий после воздействия теп-

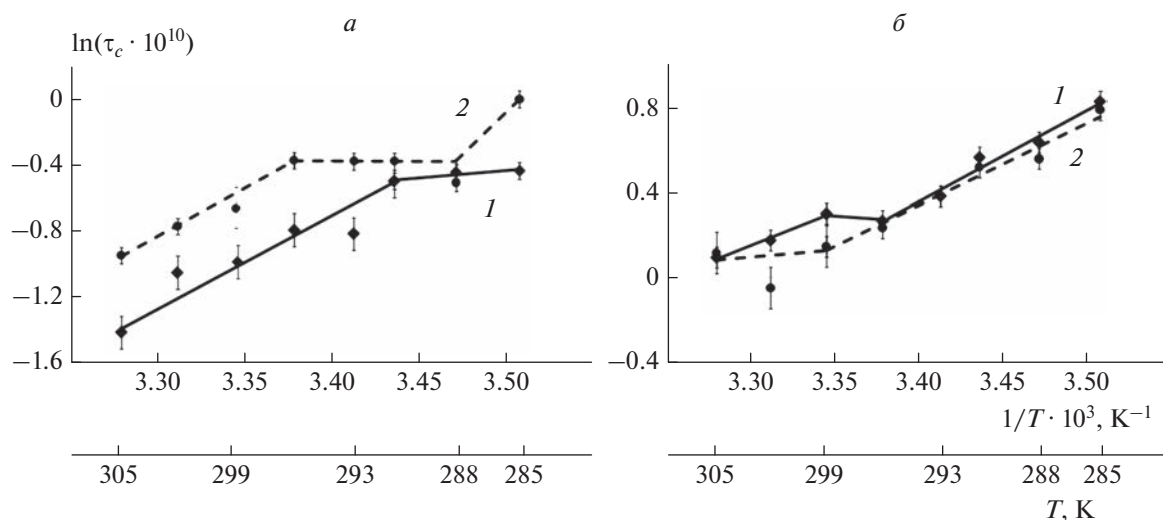


Рис. 2. Температурная зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха *Pisum sativum* L., подвергнутого тепловому шоку, в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана еще и T): 1 – без ресвератрола, 2 – в присутствии ресвератрола в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М; а – “липидный” зонд, б – “белковый” зонд.

лового шока *in vitro*. Показано, что введение ресвератрола в дозе $5 \cdot 10^{-6}$ М приводило к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов в липидной и прибелковой фазе мембран в область более высоких температур относительно мембран митохондрий после воздействия ТШ (рис. 2). При этом структурные перестройки в липидных областях ($15\text{--}23^\circ\text{C}$) возвращались к состоянию, свойственному нативным растениям (табл. 1).

Стоит отметить, что энергии активации структурных состояний при высоких температурах

(>296 К) в липидной фазе и при низких температурах (<296 К) в прибелковой фазе мембран оставались такими же, как и при ТШ (табл. 1). Кроме того, ресвератрол увеличивал микровязкость мембран после воздействия ТШ в липидной фазе (рис. 2а). По-видимому, тепловой шок приводил к окислительному стрессу, из-за чего жирнокислотные хвосты липидов мембран митохондрий окислялись. В результате окисления образовывались более короткие липиды, альдегиды и диеновые конъюгаты, которые, оставаясь в мембране, не да-

Таблица 1. Термоиндуцированные структурные переходы в мембранах митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. и энергии активации (E_a) соответствующих структурных состояний

T, К	$E_a \pm \Delta E_a$, кДж/моль							
	К	ТШ	ТШ + ФД	ТШ + СМД	К	ТШ	ТШ + ФД	ТШ + СМД
	липидные области				прибелковые области			
285	170 ± 50		90 ± 30	70 ± 30	90 ± 20	36 ± 5	32 ± 2	100 ± 30
288								
291								
293								
296		47 ± 5						
299								
302	60 ± 10		49 ± 5	140 ± 30	40 ± 7	27 ± 7		25 ± 5
305								

Примечание: К – контроль (нативные растения), ТШ – после воздействия теплового шока, ТШ + ФД – после воздействия теплового шока и ресвератрола в физиологической дозе $5 \cdot 10^{-6}$ М, ТШ + СМД – после воздействия теплового шока и ресвератрола в сверхмалой дозе $5 \cdot 10^{-14}$ М. Серые зоны соответствуют структурным перестройкам. Белые зоны – мембрана находится в определенном структурном состоянии с соответствующими E_a .

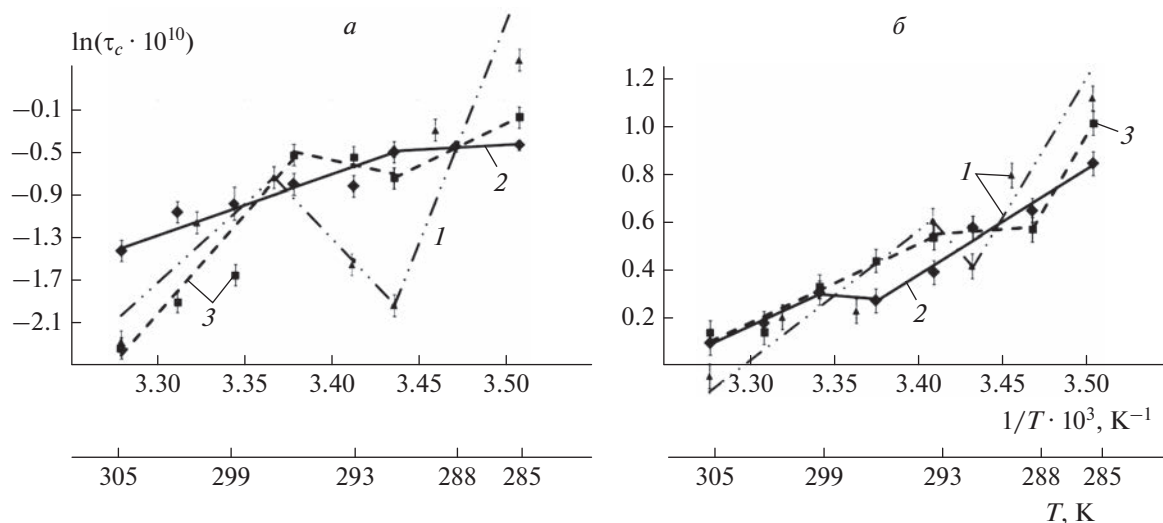


Рис. 3. Температурная зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха *Pisum sativum* L., подвергнутого тепловому шоку, в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана еще и T): 1 — для нативных растений (контроль), 2 — без ресвератрола, 3 — в присутствии ресвератрола в концентрации $5 \cdot 10^{-14}$ М; а — “липидный” зонд, б — “белковый” зонд.

вали липидам образовывать связанные структуры. Вследствие этого увеличивалась текучесть мембран. Ресвератрол, будучи антиоксидантом, значительно уменьшал скорость окисления липидов, не давая тем самым липидам распадаться на короткие фрагменты. Это приводило к увеличению структурированности мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха, подвергнутого ТШ, вместе с тем — и к увеличению микровязкости липидной фазы. Введение физиологической дозы ресвератрола практически не изменяло микровязкость прибрежковых областей мембран митохондрий после воздействия ТШ (рис. 2б) и лишь немного (на 2–4°C) смещало структурный переход в область более высоких температур: 26–32°C (299–305 К). Это означает, что кристалличность прибрежковых областей мембран повышается. Такое смещение может оказаться полезным для функционирования митохондрий в условиях длительного воздействия высоких температур (свыше 32 °C).

Особый интерес представляло изучение действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах (СМД). Эффект СМД в изменении микровязкости мембран может носить бимодальный и гетерогенный характер [28]. Бимодальность проявляется в том, что при уменьшении дозы, от физиологической ($>10^{-8}$ М) до очень низкой (10^{-8} – 10^{-11} М), эффект от препарата исчезает, сменяясь так называемой “мертвой зоной”, где он отсутствует, и вновь усиливается при концентрациях ниже $\sim 10^{-12}$ М (СМД-эффект) [23]. Этот СМД-эффект часто носит гетерогенный характер, т.е. отличается от действия биологически активных веществ в фи-

зиологических доз [28]. Поэтому было также исследовано действие ресвератрола в концентрации $5 \cdot 10^{-14}$ М на структурные характеристики мембран митохондрий проростков гороха, подвергнутых тепловому шоку (рис. 3). Введение *in vitro* ресвератрола в сверхмалой дозе в митохондрии после воздействия ТШ приводило к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов как в липидной, так и прибрежковой фазе мембран до состояния нативных растений. При этом характер зависимости времен вращательной корреляции “липидного” и “белкового” зондов от температуры при введении антиоксиданта в сверхмалой дозе в митохондрии после ТШ был схожим с соответствующими зависимостями для контрольных групп (рис. 3). Следовательно, ресвератрол в сверхмалой дозе восстанавливал структуру мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха, подвергнутого ТШ, до нормального состояния, свойственного нативным растениям. Таким образом, ресвератрол в концентрации $5 \cdot 10^{-14}$ М способен защищать растения от теплового шока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тепловой шок приводил к уменьшению кристалличности мембран митохондрий проростков гороха, о чем свидетельствует сдвиг термоиндуцированных структурных перестроек на фоне повышенной текучести мембран. Ресвератрол в сверхмалых дозах способен возвращать структурное состояние мембран митохондрий проростков гороха, подвергнутого тепловому шоку, к состоянию, свойственному нативным растениям. По-

этому мы предполагаем, что ресвератрол в сверхмалых дозах может защищать проростки гороха от теплового шока. В физиологических концентрациях исследуемый антиоксидант приводил к сдвигу термоиндуцированных структурных перестроек в мембранах митохондрий проростков гороха после воздействия теплового шока в сторону более высоких температур, что, вероятно, может оказаться полезным для нормальной работы митохондрий при длительном воздействии высоких температур (свыше 32°C).

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1201253310).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feder M.E., Parsell D.A., Lindquist S.L.* The stress response and stress proteins. *Cell Biology of Trauma*. Boca Raton: CRC Press, 1995. P. 177; <https://doi.org/10.1201/9781003067801>
2. *Li Z., Srivastava P.K.* // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 8. P. 3143; <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05983.x>
3. *Miyata Y., Yahara I.* // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 10. P. 7042; [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50533-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50533-6)
4. *Муранов К.О., Полянский Н.Б., Клейменов С.Ю. и др.* // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 12. С. 33; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19120148>
5. *Horst M., Opplige W., Rospert S. et al.* // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 1842; <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1842>
6. *Геннис Р.* Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997.
7. *Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю. и др.* // *Хим. физика*. 2021. Т. 40. № 9. С. 57; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21090089>
8. *Жигачева И.В., Бинюков В.И., Русина И.Ф. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 7. С. 41; <https://doi.org/10.31857/S0207401X20070122>
9. *Okada S., Brennicke A.* // *Mol. Genet. Genomics*. 2006. V. 276. № 1. P. 71; <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0119-7>
10. *Laczko-Dobos H., Szalontai B.* // *Biochemistry*. 2009. V. 48 № 42. P. 10120; <https://doi.org/10.1021/bi9011034>
11. *Никоноров А.А. мл., Никоноров А.А.* // *Вестн. Ур. Мед. АН*. 2011. Т. 1. № 2. С. 54.
12. *Аристархова С.А., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б. и др.* // *Докл. АН СССР*. 1976. Т. 228. С. 215.
13. *Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г.* // *Успехи химии*. 1985. Т. 54. № 9. С. 540; <https://doi.org/10.1070/RC1985v054n09ABEN003121>
14. *Бурлакова Е.Б.* Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Т. 2. М.: Химия, 2005. С. 10.
15. *Прохорова М.И.* Методы биохимических исследований. Л.: ЛГУ, 1982.
16. *Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. и др.* // *Биохимия*. 1971. Т. 36. № 6. С. 1149.
17. *Вассерман А.М., Бучаченко А.Л., Коварский А.Л., Нейман И.Б.* // *Высокомолекуляр. соединения. А*. 1968. Т. 10. С. 1930.
18. *Кузнецов А.Н.* Метод спинного зонда. М.: Наука, 1976.
19. *Кухлинг Х.* Справочник по физике. М.: Мир, 1983.
20. *Chapman D.* // *Quart. Rev. Biophys.* 1975. V. 8. № 2. P. 185; <https://doi.org/10.1017/S0033583500001797>
21. *Shinitzky M., Inbar M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1976. V. 433. № 1. P. 133; [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90183-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90183-8)
22. *Комов В.П.* Биохимия: учебник для вузов. М.: Юрайт, 2021.
23. *Гендель Л.Я., Гольдфельд М.Г., Кольтовер В.К. и др.* // *Биофизика*. 1968. Т. 13. № 6. С. 1114.
24. *Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б.* // *Успехи биол. химии*. 2003. Т. 43. С. 59.
25. *Жигачева И.В., Бинюков В.И., Генерозова И.П. и др.* // *Физиология растений*. 2022. Т. 69. № 1. С. 1; <https://doi.org/10.31857/S0015330322010225>
26. *Веселов А.П.* Дис. ... д-ра биол. наук. Н. Новгород: ННГУ, 2001.
27. *Смирнова А.Н., Швыдкий В.О., Шишкина Л.Н.* // *Хим. физика*. 2021. Т. 40. № 7. С. 43; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21070104>
28. *Бурлакова Е.Б.* // *Вестн. РАН*. 1994. Т. 64. № 5. С. 425.