

УДК 576.311.5;577.352.3+577.23

**Е. М. Миль, В. И. Бинюков, И. В. Жигачева, А. А. Албантова,
С. Г. Фаттахов, А. И. Коновалов, Г. Е. Заиков, Ю. А. Тунакова**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ МЕЛАФЕНА НА МИТОХОНДРИИ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА МЕТОДОМ АСМ

Ключевые слова: мелафен, митохондрии гороха, атомно- силовая микроскопия (АСМ).

В нашей работе методом атомно-силовой-микроскопии (АСМ) исследовали влияние комбинированного воздействия недостаточного увлажнения, умеренного охлаждения (10-14⁰С) и обработки семян гороха (Pisum sativum) регулятором роста растений мелафеном (меламиновая соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты) на морфологию митохондрий 5-ти дневных проростков. Комбинированное действие недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения приводило к изменению морфологии митохондрий. Наблюдалось существенное увеличение объема (набухание) митохондрий и уменьшение количества делящихся митохондрий по сравнению с митохондриями, изолированными из контрольной группы. Обработка семян 2 x 10⁻¹²М раствором мелафена предотвращала набухание митохондрий и сохраняла их способность к делению.

Keywords: melaphen, mitochondria, Pisum sativum, atomic force microscopy (AFM).

In our work, we investigated the effects of combined action of insufficient moisture and moderate cooling to 10-14°C, and the processing of peas plant growth by regulator melaphen (the melamine salt of bis (ox methyl) phosphoric acid) on the AFM images of isolated mitochondria 5 day-old seedlings of pea (Pisum sativum). Atomic force microscopy (AFM) revealed a statistically significant change in the shape of mitochondria (swelling mitochondria) when exposed to cold-drought and detected reducing the effect by the action of the drug melaphen at concentrations of 2 x 10⁻¹²M preserve from swelling mitochondria and revealed the ability to divide.

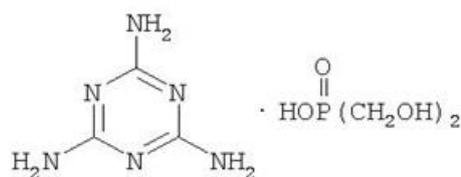
Введение

В природе растительный организм подвергается действию не одного, а сразу нескольких факторов окружающей среды. В этой связи актуальным является изучение перестроек метаболизма растительной клетки при совместном воздействии нескольких абиотических факторов, в частности сочетанного действия недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения.

Энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях растительной клетки. При этом митохондриям отводится ключевая роль в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетке [1]. Было обнаружено, что изменение температуры окружающей среды приводит к изменению липидного состава мембран митохондрий. В то же время происходит изменение количества и степени насыщенности свободных жирных кислот, что, вероятно, является признаком действия стресс фактора [2]. Увеличение количества свободных жирных кислот (СЖК) изменяет редокс-состояние внутренней мембраны митохондрий, что приводит к экспрессии генов первичного ответа (стресс генов) [3]. Недостаточное увлажнение, солевой стресс и тепловой шок являются причиной смещения антиоксидантно-прооксидантного равновесия и увеличения уровня активных форм (АФК) в клетке. На основании этого можно прийти к заключению, что митохондрии являются функционально-зависимыми органеллами. В клетках животных и дрожжей эти органеллы объединены в разветвленную сеть, именуемую "митохондриальным ретикулумом" [4]. У высших расте-

ний митохондрии одиночны и имеют либо сферическую, либо цилиндрическую форму [5]. В условиях стресса (тепловой шок, гипоксия, УФ-облучение, или при воздействии сильных окислителей), митохондрии образуют плотные кластеры, группирующиеся вокруг хлоропластов или в других областях цитозоля. Формирование «гигантских митохондрий» сопровождается увеличением генерации АФК. Антиоксиданты предотвращают как образование «гигантских митохондрий», так и рост генерации АФК этими органеллами [6,7]. Стандартная процедура выделения митохондрий в растворе сахарозы приводит к полному разрушению межмитохондриальных контактов. По этой причине, митохондрии представлены в виде отдельных пузырьков. Морфология изолированных митохондрий, возможно, отражает их функциональное состояние [8].

В нашей работе мы исследовали совместное влияние дефицита влаги, умеренного охлаждения до 10-14⁰С, и обработки семян гороха регулятором роста растений мелафеном (меламиновой солью бис(гидроксиметил) фосфиновой кислоты):



на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и АСМ имиджи изолированных митохондрий 5 дневных проростков гороха (Pisum sativum).

Экспериментальная часть и обсуждение

Семена гороха (*Pisum sativum* L.) замачивали в течение 60 мин либо в воде, либо в 2×10^{-12} М растворе мелафена. Спустя 2-ое суток половину проростков, обработанных мелафеном, переносили на сухую фильтровальную бумагу в открытые кюветы, где они находились при 14°C в течение двух суток (засуха + холод + мелафен). Вторая половина семян, обработанных мелафеном, и половина контрольных семян в течение этого же времени находилась в закрытых кюветках с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой при 14°C (холод и холод + мелафен). Через двое суток все проростки переносили в помещение с температурой воздуха 22°C и помещали в закрытые кюветы с периодически увлажняемой бумагой. Контрольная группа проростков в течение всего эксперимента находилась при температуре 22°C . На пятый день подсчитывали число проросших семян и выделяли митохондрии. Выделение митохондрий из 5-дневных эпикотилей проростков гороха (*Pisum sativum*), сорт Альфа проводили по методу [9] в нашей модификации. Эпикотили гороха длиной 3-6 см (20-25 г) гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей: 0,4 М сахарозу, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиоэритрита и 0.1% БСА (свободный от жирных кислот). Гомогенат центрифугировали при $25000g$ в течение 5 мин. Второе центрифугирование - в течение 3 мин при $3000g$. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при $11000g$. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4), 0.1% БСА, (свободный от жирных кислот), и вновь осаждали митохондрии при $11000g$ в течение 10 мин.

Образцы митохондрий для АСМ готовили на полированной силиконовой подложке перед воздушной сушкой митохондрии на подложке промытые буфером без БСА фиксировали 2% глутаровым альдегидом в течение 2 мин с последующей промывкой водой и воздушной сушкой. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150кГц в полуконтактном режиме. Использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10нм. Геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя "Image Analysis" и "Statistica 6". Сечение производили на высоте 30 нм. В каждой выборке более 80 имиджей.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [10]. Липиды экстрагировали из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка, смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему). Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Митохондрии гомогенизировали в течение 1 мин при температуре 10°C , затем к смеси добавляли равный объем дистиллированной воды, быстро смешивали и переносили в 12 мл центрифужные стаканы. (Промывание водой необходимо для удаления флавиновых компонентов, имеющих максимум флуоресценции в области 520 нм). Центрифугировали в течение 5 мин при $600g$. Отбирали 3 мл нижнего (хлороформного) слоя и добавляли 0,3 мл метанола. Регистрацию флуоресцен-

ции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветках на спектрофлуориметре FluoroMax-NoribaYvon GmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

В результате эксперимента методом АСМ удалось обнаружить, что АСМ имиджи митохондрий проростков гороха, подвергшихся двухдневному воздействию недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения, существенно изменялись и отличались от контрольных образцов. Причем появлялось большое количество набухших митохондрий.

На рисунках 1 и 2 представлено объемное изображение АСМ имиджей митохондрий из проростков гороха в контроле (сходные типы митохондрий были обнаружены при действии мелафен-хол-зас) (рис. 3) и при действии хол.-зас (рис. 4).

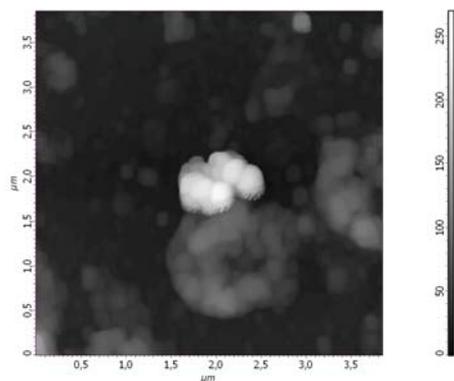


Рис. 1 - АСМ имидж митохондрий из проростков гороха в контроле

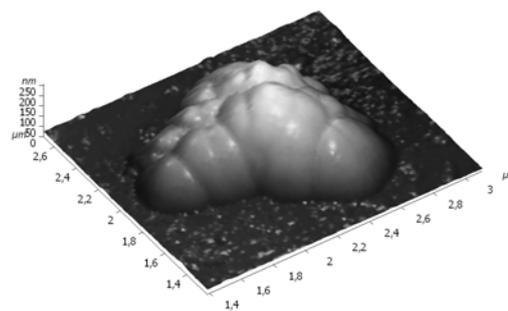


Рис. 2 - АСМ имидж митохондрий из проростков гороха при воздействии холод-засуха

Методом АСМ были получены имиджи митохондрий и проведена обработка с использованием программы Imidge Analysis. На гистограммах распределения площади, средней высоты и объема АСМ имиджей митохондрий в контроле, при действии холод-засуха и мелафен холод-засуха. Видно, что при действии недостаточного увлажнения в сочетании с умеренным охлаждением возрастает площадь и ширина распределения. Возрастает также и средняя высота митохондрий. Данные статистики приведены на рис.3 и в таблице 1.

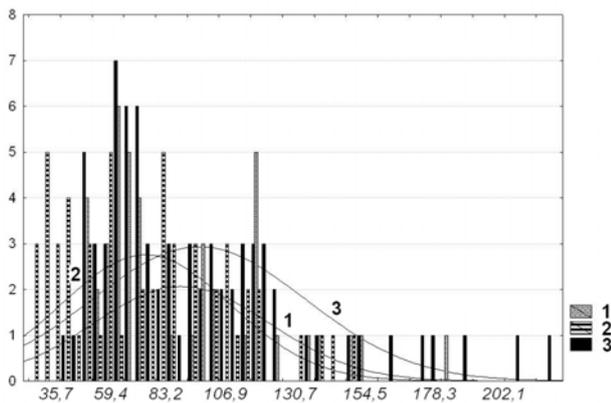


Рис. 3 - Гистограммы распределения средней высоты митохондрий (нм) и аппроксимация нормальным распределением: 1 - контроль, 2 - мелафен+холод+засуха, 3 - холод+засуха

Таблица 1 - Геометрические параметры АСМ имиджа митохондрий и 95% доверительный интервал

площадь имиджа	ср.значение(мкм ²)	-0,95	+0,95
контроль	2,3	1,5	3,1
мел-хол-зас	1,7	1,1	2,3
хол-зас	3,6	2,3	4,9
ср.высота имиджа	ср.значение (нм)	-0,95	+0,95
контроль	82,3	68,1	96,4
мел-хол-зас	75,0	64,3	85,6
хол-зас	101,5	90,5	112,4

Наблюдалось увеличение высоты, площади имиджа и объема ряда митохондрий, а число делящихся митохондрий существенно уменьшалось. Статистический анализ длины и объема предварительно фиксированных глутаровым альдегидом митохондрий, приведенный в таблице 1, рис. 3 свидетельствует о появлении одиночных митохондрий большего объема и длины в группе проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, по сравнению с контрольной группой. Сходные результаты были получены [11].

Сопоставляя данные, полученные в нашем эксперименте, с литературными данными, можно предположить, что при сочетанном действии умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения в клетках проростков гороха, вероятно, происходило увеличение генерации АФК с последующим набуханием митохондрий [7]. Действительно, в мембранах митохондрий этой группы проростков наблюдалась активация ПОЛ. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 2,5- 3 раза (рис.4). Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена приводила к снижению содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня (рис.4). Такая обработка предотвращала изменения морфологии митохондрий. Размеры митохондрий приближались к контрольным.

При этом происходило увеличение числа делящихся митохондрий, деление митохондрий было таким же, как это наблюдалось в контроле.



Рис. 4 - Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях действия недостаточного увлажнения с умеренным охлаждением и обработки семян гороха мелафеном

Можно предположить, что защитный эффект препарата обусловлен его антиоксидантными свойствами [12]. С другой стороны применяемая концентрация препарата очень мала (2×10^{-12} М), поэтому можно предположить, что одновременно могут осуществляться и другие механизмы действия препарата. Защитный эффект мелафена может быть связан с активацией митохондриального АТФ-чувствительного калиевого ($P_{mitoK_{ATP}}$) канала, что приводит к снижению генерации АФК митохондриями и предотвращает их набухание [13,14]. Поскольку мелафен в сверхмалых концентрациях предотвращает набухание митохондрий, можно предположить, что он регулирует активацию $P_{mitoK_{ATP}}$ в нативных митохондриях, где препарат может взаимодействовать с его каналобразующей субъединицей, встроенной в мембрану митохондрий. Ранее было показано, что мелафен в растениях обладает сигнальными свойствами, сходными с действием молекулы АТФ, а также природных фитогормонов, таких как кинетин, основной функцией которых является стимулирование роста и деления клеток [15].

Сходство и расположение зарядов на поверхности (доступной для молекулы воды) в области пуриновых групп молекулы АТФ, рассматриваемого цитокина и мелафена, довольно схожи, что предполагает, что мелафен также может взаимодействовать с аденин-связывающими участками в растительной клетке.

В настоящее время установлено, что АТФ играет не только субстратную роль (поставляя энергию), но и в очень малых концентрациях выполняет сигнальную функцию, усиливая передачу сигналов через рецепторы АТФ на внешней мембране клеток, в частности, сигналов к росту и делению [16].

Можно предположить, что мелафен также относится к тем специфическим химическим факторам, который подобно АТФ способен в сверхнизких концентрациях регулировать рост растительной клетки. Возможно, он действует подобно АТФ при контакте с внешней мембраной растительных клеток и вызывает усиление роста и деления. По лите-

ратурным данным рост - стимулирующий эффект мелафена обусловлен активацией энергетических процессов, в частности, дыхания и фотосинтеза (циклического фотофосфорилирования) [17]. При этом увеличивалась и общая скорость теплопродукции, характеризующая эффективность использования энергии клеткой. Полученные результаты на культуре клеток хлореллы, митохондриях из запасающей паренхимы сахарной свеклы и проростков гороха [18] позволили сделать заключение, что мелафен, обладая высокой полифункциональной физиологической активностью в низких концентрациях, может быть рекомендован в качестве регулятора роста растений, отвечающий современным требованиям технологий для испытания на ведущих сельскохозяйственных культурах [19,20].

Выводы

Методом атомно-силой микроскопии (АСМ) обнаружено статистически достоверное изменение формы митохондрий - набухание и уменьшение числа делящихся митохондрий при сочетанном действии недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения. Препарат мелафен в концентрации 2×10^{-12} М предотвращает морфологические изменения митохондрий и восстанавливает их способность к делению.

При сочетанном действии недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения наблюдалась активация ПОЛ. Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена приводила к снижению содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня. Предполагается, что протекторные свойства препарата обусловлены его антиоксидантными свойствами, а также с его сигнальной функцией, сходной с действием АТФ в качестве сигнальной молекулы.

Из молекулярного моделирования следует, что меламинавая часть молекулы мелафена имеет сходство поверхности молекулы доступной для воды, а также распределению зарядов на этой поверхности с молекулой АТФ и с молекулами аденин-содержащих цитокинов (в том числе кинетина), что может быть связано с механизмом его воздействия на растительные клетки.

Поскольку мелафен предотвращает набухание митохондрий и восстанавливает процесс

деления этих органелл, не исключено, что он участвует в регуляции активации PmitoK_{ATP}.

Литература

1. В.П. Скулачев, В сб. *соровский образовательный журнал*, **3**, 4- 10(1996);
2. М.Е. Rodríguez, O. Canales, O. Borrás-Hidalgo. *Molecular aspects of abiotic stress in plants*, *Biotechnología Aplicada*, **22** (1), 1-10(2005);
3. В.К. Войников, Всероссийский симпозиум Ядерно-митохондриальные взаимоотношения при редокс-регуляции экспрессии генов растений при стрессах (Россия, Москва 9-12 ноября 2010 г, С. 90-9);
4. L.E. Bakeeva, Yu.S. Chentsov, V.P. Skulachev V.P. *Biochim. et biophys. acta*. 1978. **501**(3), 349-369 (1978);
5. D.C. Logan, C.J. Leaver. *J. Exp. Bot.*, **51**, 865-871(2000);
6. I. Scott, D.C Logan, Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis, *New Phytologist*, **177**, 90-101 (2008);
7. L. Zhang, Li. Yinshu, Da-Xing, Caiji Gao, *Journal of Experimental Botany*, **60**, 2073-2091(2009);
8. S.M. Claypoole, J.M. McCaffery, *J. Cell Biol*, **174**, 3, 379-390(2006);
9. В.Н Попов, Э.К Руге, А.А. Старков *Биохимия*, **68**(7), 910-916 (2003);
10. B.I. Fletcher, C.D. Dillard, A.L. Tappel, *Anal. Biochem*, **52**, 1-99 (1973);
11. D. C. Logan D. C, I. Scott, *New Phytol*, **177**, 90-101(2008);
12. И.В. Жигачева, Л.Д. Фаткуллина, И.Ф. Русина, А.Г. Шугаев, И.П. Генерозова, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов, *ДАН*, **414**(2), 263-265(2002);
13. D. Pastore, M.C Stoppelli, Di. Fonzo N, Passarella S, *J. Biol. Chem*, **274**, P. 26683-26690(1999);
14. V, Casolo, E Petrusa, J. Krajňáková, F. Macri, A. Vianello, *J. Experem. Botany*, V. **56**, 997-1006 (2005);
15. О.А. Кашина, *ДАН*, **405** (1), 123-124(2005);
16. Д. Бернсток, *В мире науки*, **2**, 68-75(2010);
17. С.Г. Фаттахов, Н.Л. Лосева, А.И. Коновалов, В.С. Резник, А.Ю. Алябьев, Л.Х. Гордон, В.И. Трибунских, *ДАН*, **394**, 127-129(2004);
18. И.В. Жигачёва, Л.С. Евсеенко, Е.Б. Бурлакова, С. Г. Фаттахов, академик А. И. Коновалов, *ДАН*, **427**(5), 693-695(2009);
19. I.V. Zhigacheva, E.B. Burlakova, I.P. Generozova, A.G. Shugaev and S.G. Fattahov *JBSB*, **2**(1), 1-8(2010);
20. И.В. Жигачева, Е.Б. Бурлакова, А.Г. Шугаев, И.П. Генерозова, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов, Биологические мембраны, **25**(3), 183-189(2008).

© **Е. М. Миль** - д.б.н., вед. науч. сотр. ИБХФ РАН, elenamii2004@mail.ru; **В. И. Бинюков** - к.б.н., вед. науч. сотр. ИБХФ РАН, bin707@mail.ru; **И. В. Жигачева** - д.б.н., ст. науч. сотр. ИБХФ РАН, zhigacheva@mail.ru; **А. А. Албантова** - асп. ИБХФ РАН; **С. Г. Фаттахов** - к.х.н., ст. науч. сотр. ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН; **А. И. Коновалов** - акад., ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН; **Г. Е. Заиков** - д.х.н., проф. Института биохимической физики им.Н.М.Эмануэля РАН; **Ю. А. Тунакова** - д.х.н., проф. каф. технологии пластических масс КНИТУ, juliaprof@mail.ru.