

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 растений 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 10-14°C, 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 2x10⁻¹² 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 кюветах 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 KH_2PO_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 KH_2PO_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 флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon 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 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 ($2 \times 10^{-12} \text{M}$), 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_{mitoKATP}) 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_{mitoKATP} 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 литературным 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 $P_{mitoKAT\Phi}$.