

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА, В НОРМЕ *in vitro*

© 2021 г. Н.Ю. Герасимов*, О.В. Неврова*, И.В. Жигачева*,
И.П. Генерозова**, А.Н. Голощанов*

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

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

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

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

После доработки 08.12.2020 г.

Принята к публикации 09.12.2020 г.

Изучено действие антиоксиданта ресвератрола в различных концентрациях на микровязкость мембран митохондрий, выделенных из клеток листьев гороха. Показано, что ресвератрол в физиологических ($5 \cdot 10^{-6}$ М) и сверхмалых ($5 \cdot 10^{-14}$ М) дозах изменял микровязкость и структуру липидного бислоя мембран. По-видимому, данный антиоксидант путем изменения структуры липидного окружения мембранных белков изменяет их активность и таким образом влияет на активность и функции митохондрий. В областях доз между физиологическими и сверхмалыми не было обнаружено никаких изменений, т.е. наблюдалась «мертвая зона». Кроме того, было выявлено, что ресвератрол в физиологических концентрациях сдвигает термоиндуцированный структурный переход в область более низких температур, что может мешать нормальной регуляции естественных процессов.

Ключевые слова: структура мембран, микровязкость мембран, антиоксидант.

DOI: 10.31857/S0006302921030091

Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене и регулируют поток кальция в клетках [1, 2]. В настоящее время в литературе с большим интересом изучаются процессы кодирования митохондриальных белков с помощью регуляции ядерного генома и активность митохондриальной транскрипции через регуляторы суточного цикла в растениях [3–5]. Все больше информации о связи между дыхательной цепью и вводимыми белковыми комплексами [6] и о митохондриальной реакции на стресс [7]. Объем получаемых данных представляет собой превосходный инструмент для получения более полного представления о молекулярных компонентах сложной митохондриальной системы с целью целесообразного моделирования и регулирования функции митохондрий.

Интересно, что полифенольные соединения оказывают непосредственное влияние на структуру и функцию митохондрий. Растительные полифенолы взаимодействуют с белками, такими как сигнальные киназы, факторы транскрипции и ионные каналы [8] и регулируют окислительно-

восстановительные процессы, аналогичные митохондриальным. Одним из наиболее распространенных полифенольных соединений является ресвератрол. Он известен как биологически активный компонент красного вина с антиоксидантной активностью, который улучшает функции митохондрий [9, 10]. Показана противораковая активность ресвератрола, которая может быть обусловлена его способностью вызывать апоптоз в клетках лейкемии и рака молочной железы человека [11]. Однако до настоящего времени не было информации о прямом изменении митохондриальной активности ресвератролом растений и о его механизме действия.

Действие антиоксидантов на биологические мембраны объясняется системой регуляции пероксидного окисления липидов [12–14], которая напрямую связана с микровязкостью мембран. В то же время активные формы кислорода генерируются, главным образом, митохондриями.

Таким образом, целью нашей работы было провести исследование и оценить влияние ресвератрола, как сильного природного антиоксиданта и активатора, на митохондрии гороха в норме, пытаясь спрогнозировать возможную роль ресвератрола в качестве модулятора активности мито-

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, E_a – энергия активации.

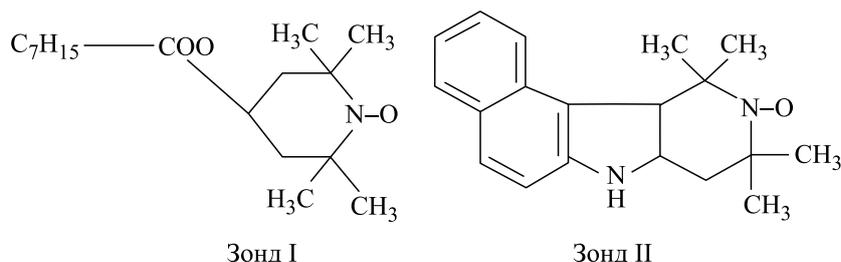


Рис. 1. Структурные формулы использованных спиновых зондов.

хондрий, что открывает новые возможности в защите растений от стресс-факторов, связанных с митохондриальной дисфункцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии получали из клеток листьев гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг/мл.

Ресвератрол готовили последовательным стократным разбавлением в среде выделения так, чтобы концентрация в образцах с митохондриями при конечном разбавлении составляла $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-12}$ и $5 \cdot 10^{-16}$ М. Методика приготовления сверхмалых доз биологически активного вещества показана, например, в работах [15, 16].

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные 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) (рис. 1), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

В работе [17] 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 $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_+ \cdot ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$, приведенной в работе [18]. Реги-

страцию спектров ЭПР проводили в диапазоне температур 283–317 К (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Bruker (США).

Известное соотношение Стокса–Энштейна (см., например, работу [19]) связывает параметр τ_c и вязкость среды, окружающей зонд $\tau_c = \eta V/kT$, где V – объем радикала (его можно считать прямо пропорциональным молекулярной массе); η – динамическая вязкость среды; k – постоянная Больцмана и T – абсолютная температура. Динамическая вязкость η связана с температурой следующим эмпирическим соотношением $\eta = A'e^{b/T}$ [20], откуда следует $\ln \tau_c = A'' + b/T + \ln(1/T)$, где A' , A'' и b – константы. Исследуемый нами температурный интервал (от 283 до 305 К) достаточно узок, 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 линию, точки излома которой являются точками структурных переходов [21]. Наклон этих прямых позволяет определить энергию активации перехода $\Delta E_a = bR$ [22], где b – коэффициент наклона соответствующего прямого участка, а R – универсальная газовая постоянная. Энергия активации соответствует энергии перестройки одного моля липидов мембран [22].

Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Office Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы (рис. 2 и 3) и при действии ресвератрола в физиологической ($5 \cdot 10^{-6}$ М, рис. 2) и сверхмалой ($5 \cdot 10^{-14}$ М, рис. 3) концентрациях. Для контрольной группы наблюдали термоиндуцированный

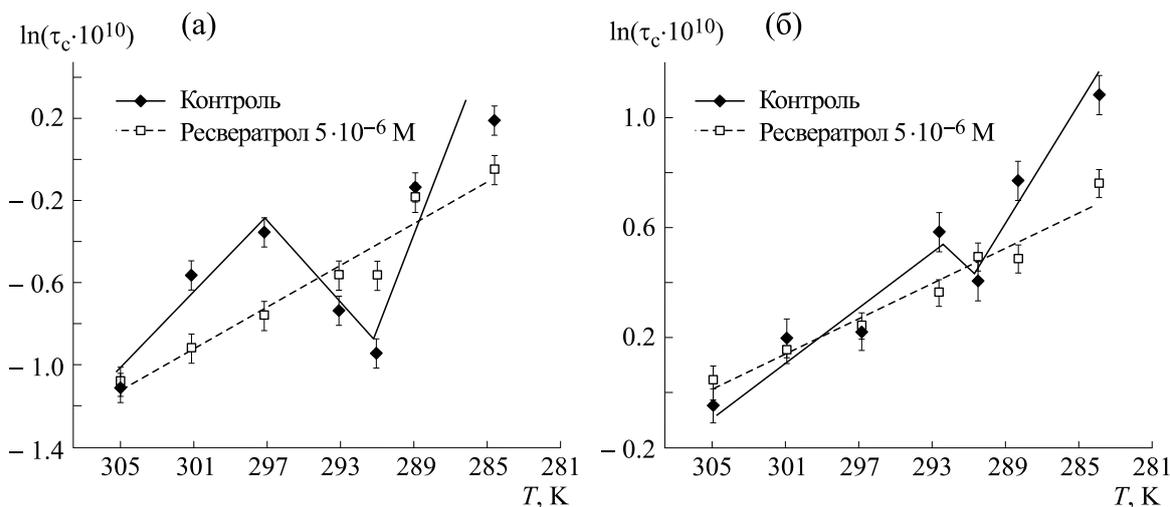


Рис. 2. Температурные зависимости микровязкости мембран митохондрий в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указаны величины T для контрольной группы и концентрации ресвератрола $5 \cdot 10^{-6} M$): (а) — белковый зонд, (б) — липидный зонд.

структурный переход в обеих областях мембран (липидных и прибелковых) при температурах от 18 до 20°C (291–293 K). Введение антиоксиданта в концентрации $5 \cdot 10^{-6} M$ приводило к исчезновению структурных перестроек в мембранах. Вероятно, ресвератрол в физиологических дозах сдвигает структурный переход в область температур вне изученной области. Напротив, введение антиоксиданта в сверхмалой концентрации не изменяло положение термоиндуцированных перестроек в липидном бислое (рис. 3). Следует отметить, что обе концентрации препарата уменьшали микровязкость как липидной, так и прибел-

ковой фазы мембран митохондрий (рис. 4). Этот факт, по-видимому, связан с уменьшением окисления липидов вследствие введения антиоксиданта и накоплением ненасыщенных жирных кислот в мембране.

На рис. 4 представлена дозовая зависимость эффекта ресвератрола на микровязкость мембран при температуре 12°C (285 K), наиболее благоприятной для цветения гороха [23], при которой структурные переходы не наблюдались (рис. 2 и 3). Максимальное действие антиоксиданта наблюдалось, по сравнению с другими дозами, для

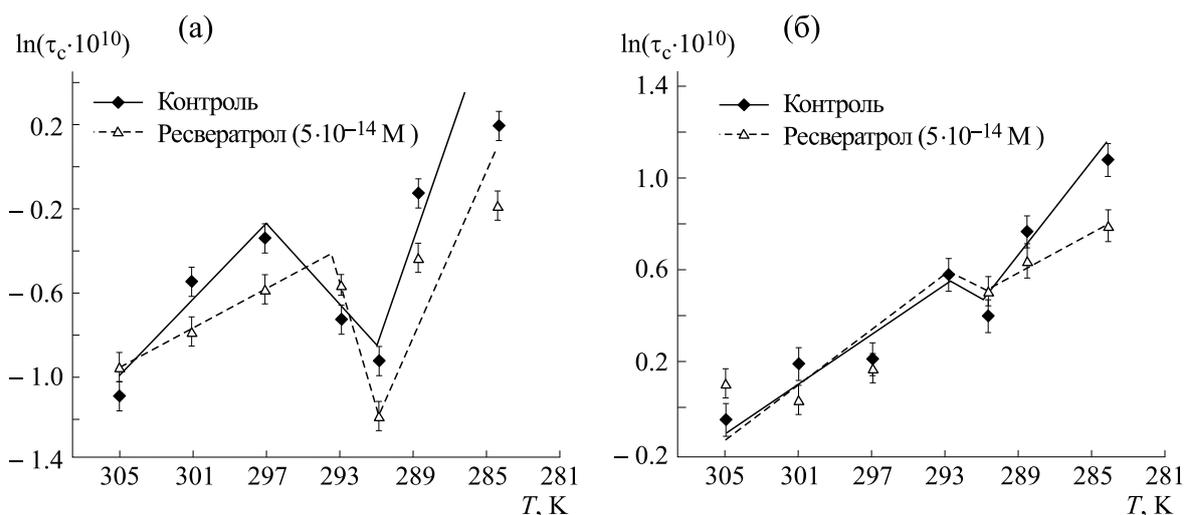


Рис. 3. Температурные зависимости микровязкости мембран митохондрий в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указаны величины T для контрольной группы и концентрации ресвератрола $5 \cdot 10^{-14} M$): (а) — белковый зонд, (б) — липидный зонд.

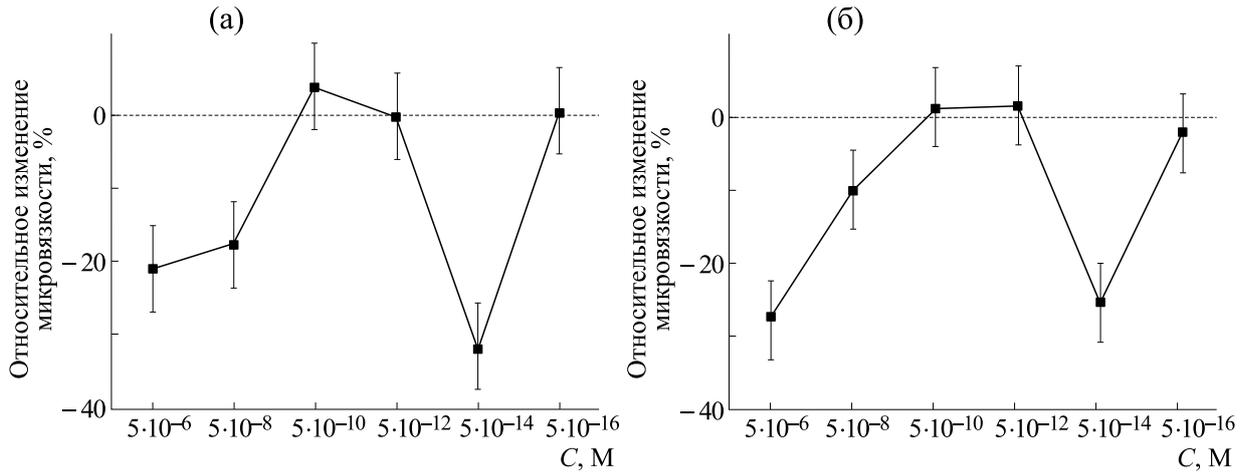


Рис. 4. Зависимость изменения микровязкости (отн. изм. = $(\tau_c - \tau_{c \text{ контр}})/\tau_{c \text{ контр}}$) митохондрий гороха от концентрации ресвератрола ($T = 285 \text{ K}$): (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

большой ($5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) и для сверхмалой ($5 \cdot 10^{-14} \text{ M}$) концентраций (рис. 4). В областях доз между физиологическими и сверхмалыми, $5 \cdot 10^{-10}$ и $5 \cdot 10^{-12} \text{ M}$, ресвератрол практически не изменял микровязкость мембран митохондрий по сравнению с контролем, т.е. в данной области наблюдалась (рис. 4) так называемая «мертвая» зона [24]. Данный антиоксидант при 12°C (285 K) в концентрации $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ приводит к уменьшению микровязкости липидных областей мембраны на 20% по отношению к контролю (рис. 4а), а микровязкость при белковых областях (рис. 4б) уменьшалась на 30%. При этом изменение микровязкости в при белковых областях даже на 10% может быть очень существенно, так как может привести к значительным изменениям энергетики клеток.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* ресвератрол приводит к уменьшению микровязкости мембран в сверхмалой и физиологической концентрации. В то же время сдвиг термоиндуцированного структурного перехода является нежелательным, так как это указывает на значительное изменение структуры липидного бислоя. Это, в свою очередь, может мешать нормальной регуляции естественных процессов при защите от стресс-факторов. Поэтому ресвератрол в сверхмалой дозе ($5 \cdot 10^{-14} \text{ M}$) при воздействии на структуру мембран митохондрий обладает явным преимуществом перед физиологической концентрацией ($5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$).

В таблице схематически изображены термоиндуцированные структурные переходы и структурные состояния мембран в разных областях температур с соответствующими энергиями активации (E_a). При введении ресвератрола в сверхмалых дозах энергия активации структурного состояния

липидных областей мембраны при низких температурах ($285\text{--}291 \text{ K}$) практически не менялась, тогда как при высоких температурах ($297\text{--}305 \text{ K}$) уменьшалась приблизительно в два раза. В отличие от липидных, в при белковых областях введение антиоксиданта в сверхмалой концентрации приводило к значительным (\sim в три раза ниже контроля) изменениям энергии активации при низких температурах ($285\text{--}291 \text{ K}$). При высоких температурах E_a не изменялась, оставаясь на уровне контроля. Следовательно, можно предположить, что сразу после введения ресвератрола в сверхмалых дозах приводил к изменению структуры при белковых областей мембраны. При повышении температуры липиды в мембране перестраивались таким образом, что структура при белковых областей бислоя возвращалась к норме за счет миграции липидов из липидной фазы в при белковую область мембран, что приводило к изменению структуры липидных областей бислоя. Введение ресвератрола в больших дозах приводило к исчезновению термоиндуцированных структурных перестроек как в липидной, так и при белковой фазах мембран. Вероятнее всего, структурное состояние мембран митохондрий при введении большой дозы ресвератрола соответствует структурному состоянию мембран контрольной группы при высоких температурах, судя по близким значениям их энергии активации. Из этого следует, что соответствующие переходы сместились в область более низких температур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ресвератрол в физиологических и сверхмалых дозах изменял структуру мембран митохондрий, выделенных из листьев гороха. Поскольку активность мембранных белков су-

Структурные состояния липидного бислоя митохондрий листьев гороха при разных температурах с соответствующими энергиями активации

T, К	Липидные области			Прибелковые области				
	Контроль	Ресвератрол, 5·10 ⁻⁶ М	Ресвератрол, 5·10 ⁻¹⁴ М	Контроль	Ресвератрол, 5·10 ⁻⁶ М	Ресвератрол, 5·10 ⁻¹⁴ М		
	<i>E_a</i> , кДж							
285	170 ± 50	40 ± 7	150 ± 40	90 ± 20	25 ± 5	30 ± 5		
289								
291								
293								
297								
301	60 ± 10			35 ± 5		40 ± 7		40 ± 10
305								

Примечание. Закрашенные области соответствуют термоиндуцированным структурным переходам.

щественно зависит от липидного окружения [25], данный антиоксидант путем изменения структуры липидного бислоя может изменять активность белков и ферментов, таким образом влияя на активность и функции митохондрий. В областях доз между физиологическими и сверхмалыми не было обнаружено никаких изменений, т.е. наблюдалась «мертвая» зона. Кроме того, было выявлено, что ресвератрол в физиологических концентрациях сдвигает термоиндуцированный структурный переход в область более низких температур, что может мешать нормальной регуляции естественных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ленинджер, *Основы биохимии* (Мир, М., 1985), т. 1.
2. S. Stael, A. G. Rocha, A. J. Robinson, et al., *FEBS Lett.* **585** (24), 3935 (2011).
3. Г. М. Дымшиц, *Природа* **6** (1042), 54 (2002).
4. M. W. Nameed, I. Juszczak, R. Bock, and J. T. van Dongen. *Plant Methods* **13**, 112 (2017).
5. S. Okada and A. Brennicke, *Mol. Genet. Genomics* **276** (1), 71 (2006).
6. D. C. Wallace, *Cell* **163** (1), 33 (2015).
7. M. Picard, B. S. McEwen, E. S. Epel, and C. Sandif, *Front Neuroendocrinol.* **49**, 72 (2018).
8. B. Dasgupta and J. Milbrandt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7217 (2007).
9. M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, et al., *Cell* **127**, 1109 (2006).
10. Z. Ungvari, N. Labinsky, P. Mukhopadhyay, et al., *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **297**, H1876 (2009).
11. S. Pervaiz, *Leuk. Lymphoma* **40** (5–6), 491 (2001).
12. С. А. Аристархова, Г. В. Архипова, Е. Б. Бурлакова и др., *ДАН СССР* **228**, 215 (1976).
13. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, *Успехи химии* **54** (9), 540 (1985).
14. Е. Б. Бурлакова, в *Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты* (Химия, М., 2005), т. 2, сс.10–45.
15. Ф. Ф. Ниязи, Н. В. Кувардин и Е. А. Фатянова, *Наука и образование: новое время* **1** (1), 65 (2014).
16. Н. В. Кувардин в сб. *Мат-лы Междунар. науч.-практич. конф. «Актуальные проблемы химической науки, практики и образования»* (КурскГТУ, Курск, 2009), сс. 122–125.
17. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., *Биохимия* **36** (6), 1149 (1971).
18. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейман, *Высокомолекуляр. соединения* **10А**, 1930 (1968).
19. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
20. Х. Кухлинг, *Справочник по физике* (Мир, М., 1983).
21. D. Chapman, *Quart. Rev. Biophys.* **8**, 185 (1975).
22. M. Shinitzky and M. Inbar, *Biochim. Biophys. Acta* **433** (1), 133 (1976).
23. Р. Х. Макашева, *Горох* (Колос, Л., 1973).
24. Е. Б. Бурлакова, *Вестник РАН* **64** (М5), 425 (1994).
25. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).

Effects of Various Concentrations of Resveratrol on the Structural State of Mitochondrial Membranes Isolated from Pea Leaves *in vitro*

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

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

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

In this study, the effects of various concentrations of an antioxidant such as resveratrol on microviscosity of mitochondrial membranes isolated from pea-leaf cells were investigated. It was shown that resveratrol in physiological ($5 \cdot 10^{-6}$ M) and ultralow ($5 \cdot 10^{-14}$ M) doses changed microviscosity and altered the structure of the membrane lipid bilayer. Apparently, this antioxidant affects the activities of membrane proteins due to altered structures of lipid molecules that surround these proteins thereby influencing mitochondria activity and function. In the range between physiological dose and ultra-low dose, there were no differences, it was a “dead-zone” range. In addition, it was found that resveratrol in physiological concentrations shifted thermal induced structural transition to the lower temperature region, which might interfere with the normal regulation of natural processes.

Keywords: membrane structure, membrane microviscosity, antioxidant