

СЕРОВОДОРОД ПРИВОДИЛ К МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА *Pisum sativum* L. В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВОДЫ

© 2024 г. Н.Ю. Герасимов^{*,#}, О.В. Неврова^{*}, И.В. Жигачева^{*},
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, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия

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

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Изучено изменение структурных характеристик мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха сорта Немчиновский 100, при воздействии гидросульфида натрия в различных концентрациях. Показано, что обработка семян раствором гидросульфида натрия в дозах $2 \cdot 10^{-4}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М приводила к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов в мембранах митохондрий в область более низких температур и к увеличению микровязкости обеих (липидных и приклеточных) областей мембран митохондрий на фоне уменьшения их кристалличности. Наличие экзогенного NaHS, также как и эндогенного сероводорода, способно увеличивать активность ферментов антиоксидантной защиты и приводить к накоплению осмолитов. В результате микровязкость липидного бислоя могла увеличиваться. Для проверки данной гипотезы было исследовано влияние антиоксиданта ресвератрола на микровязкость липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха как в норме, так и при предварительной обработке семян NaHS. Также были изучены биоэнергетические характеристики митохондрий. Получены данные, подтверждающие действие сероводорода на структурные характеристики мембран митохондрий путем активации ферментов антиоксидантной защиты и накопления осмолитов.

Ключевые слова: структура мембран, митохондрии, микровязкость мембран, проростки гороха, дефицит воды, сероводород.

DOI: 10.31857/S0006302924020086, EDN: OUUKKR

Биотические и абиотические воздействия представляют собой важные лимитирующие факторы в росте, развитии, продуктивности растений. Стресс может вызывать накопление активных форм кислорода [1, 2], усиливать пероксидное окисление липидов мембран в листьях растений [3, 4]. В этих условиях активизируется сигнальная система растений, где сероводород играет ключевую роль. Молекула сероводорода (H_2S) входит в состав сигнального пути и принимает участие в ответе защиты растений от различных экзогенных стресс-факторов, в том числе, засухи, термического, окислительного, солевого и осмотического стрессов [5–10]. Есть сообщения о дозозависимом участии H_2S в митохондриальном дыхательном пути, в процессах митофагии [11] как при нарушении питания, задержки роста и

развития растения, так и в повышении устойчивости к стрессам у растений [12–16]. Семена растения в период прорастания очень уязвимы к внешним воздействиям, в том числе к обезвоживанию [17, 18]. Обработка H_2S семян кукурузы [6] или арабидопсиса [19] в условиях стресса улучшала прорастание семян. В ответ на стресс сероводород активировал экспрессию генов некоторых защитных ферментов в мутантных проростках *Arabidopsis thaliana* [20], в корнях клубники [21], синтетазы кукурбитацина С в листьях огурца [8], регулировал активность антиоксидантных ферментов: аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы, гваяколпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы [6, 9, 20, 22], что приводило к снижению уровня активных форм кислорода (АФК), H_2O_2 и супероксид-аниона, окиси азота (II) в клетках [7, 23], продуктов окисления липидов, в том числе и малонового диальдегида [9, 20–22, 24]. В литературе имеется некое общее представление о том,

Сокращение: АФК — активные формы кислорода.

что существует связь между окислением липидов, накоплением АФК, малонового диальдегида, присутствием H_2S и целостностью мембранного матрикса [3, 10, 16, 20]. Однако механизмы взаимного влияния этих процессов и структуры мембран плохо изучены.

Одними из экзогенных источников сероводорода являются сульфид натрия (Na_2S) и гидросульфид натрия ($NaHS$). Такую добавку удобно использовать в качестве удобрения или для обработки собранной продукции. Так, обработка сульфидом натрия собранных плодов клубники, брокколи, винограда и др. [21–23, 25–28] приводила к увеличению срока их хранения и сохранению твердой структуры после сбора урожая за счет поддержания низкого уровня АФК и ингибирования старения продуктов. Это также показывает положительное влияние данного вещества на растения через антиоксидантную активность сероводорода. Однако взаимодействие сероводорода с эндогенными активными формами кислорода и продуктами окисления липидов, а также с экзогенными антиоксидантными малыми молекулами является слабо изученным.

Целью работы было изучение изменений структуры мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха в условиях дефицита воды, при предварительной обработке семян раствором гидросульфида натрия в разных концентрациях. В рамках данной работы было также интересно исследовать антиоксидантную активность $NaHS$ и ресвератрола на структурные характеристики мембран митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L., сорт Немчиновский 100. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01%-ным раствором $KMnO_4$. После промывания семена в течение часа замачивали в воде, а затем переносили на влажную фильтровальную бумагу. Спустя 20 ч часть семян помещали на 5 ч на фильтровальную бумагу, смоченную раствором $NaHS$ в дозах $6 \cdot 10^{-3}$ М, $2 \cdot 10^{-4}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М (опытная группа). Затем проростки контрольной группы (дефицит воды) и проростки, обработанные $NaHS$, на двое суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через двое суток проростки обеих групп переносили на смоченную водой влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих двух суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков гороха всех исследуемых групп методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере: первое центрифугирование – при 25000 г в течение 5 мин, второе – при 3000 г в течение

3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей 0.4 М сахарозы, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4). Затем определяли содержание белка методом Лоури [29].

Ресвератрол готовили методом последовательного разведения таким образом, чтобы конечные концентрации в образцах составляли $5 \cdot 10^{-8}$ М и $5 \cdot 10^{-14}$ М.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфера (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ $MgCl_2$ и 0.1% бычьего сывороточного альбумина.

Для определения микровязкости суспензии митохондрий разбавляли в среде выделения, содержащей 0.4 М сахарозы и 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), таким образом, чтобы содержание белка в образце митохондрий составляло 2 мг белка на 1 мл суспензии. Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов, таких как стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-карбилокси-1-пиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидрокарболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН (рис. 1).

В работе [30] было 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 ЭПР-спектров рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (t_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $t_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_+ \cdot ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$, приведенной в работе [31]. Регистрацию ЭПР-спектров проводили в диапазоне температур 285–305 К (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Bruker (США).

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

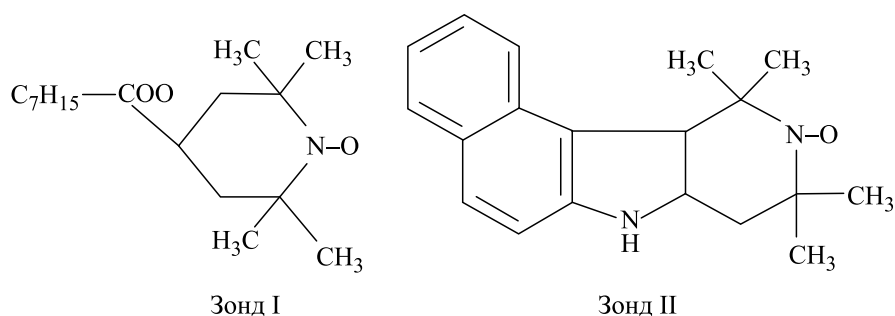


Рис. 1. Структурные формулы использованных спиновых зондов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было изучено изменение структурных характеристик мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха сорта Немчиновский 100, при воздействии различных концентраций NaHS. Для оценки структуры мембран были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы и при воздействии NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 2).

Для контрольной группы проростков гороха, находившихся в условиях дефицита воды, наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от 18°C до 20°C ($291\text{--}293\text{ K}$) в приобелковых областях (рис. 2б) и при температурах от 18°C до 24°C ($291\text{--}297\text{ K}$) в липидных областях мембран (рис. 2а). Данную низкотемпературную структурную перестройку связывают с переходом липидного бислоя из кристаллического в

жидкокристаллическое состояние [32, 33], т. е. при температурах выше температур переходов ($>293\text{ K}$ в приобелковых и $>297\text{ K}$ в липидных областях) мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии. Для контрольной группы высокотемпературные структурные перестройки, которые связывают с изменениями структуры мембранных белков [33], скорее всего, находятся за пределами исследованного интервала $>309\text{ K}$. Отметим, что такие же термоиндуцированные переходы были характерны и для растений, не подвергавшихся абиотическим стрессам [34]. При этом микровязкость обеих областей мембран митохондрий в условиях дефицита воды (контроль) оказалась ниже, чем для нативных растений (рис. 3) [34]. Увеличение текучести обеих областей мембран может быть связано с набуханием митохондрий вследствие недостаточного увлажнения [35].

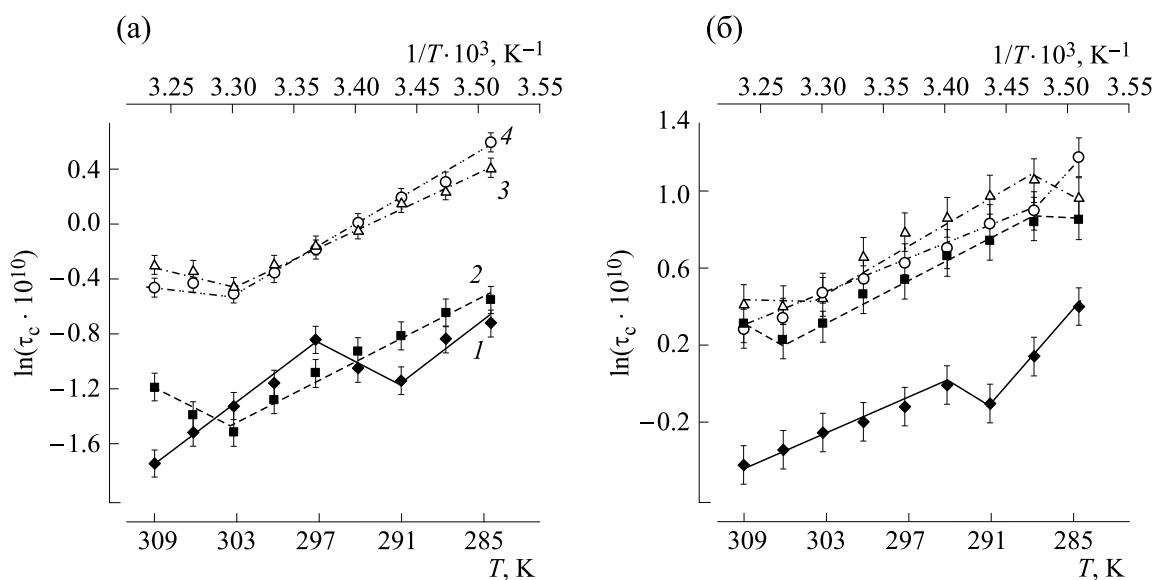


Рис. 2. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии зондов в мембране митохондрий проростков гороха, находившихся в условиях дефицита воды при воздействии сероводорода: (а) — липидный зонд, (б) — приобелковый зонд. Кривая 1 — контроль, кривая 2 — $6 \cdot 10^{-3}$ М NaHS, кривая 3 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NaHS, кривая 4 — $5 \cdot 10^{-6}$ М NaHS.

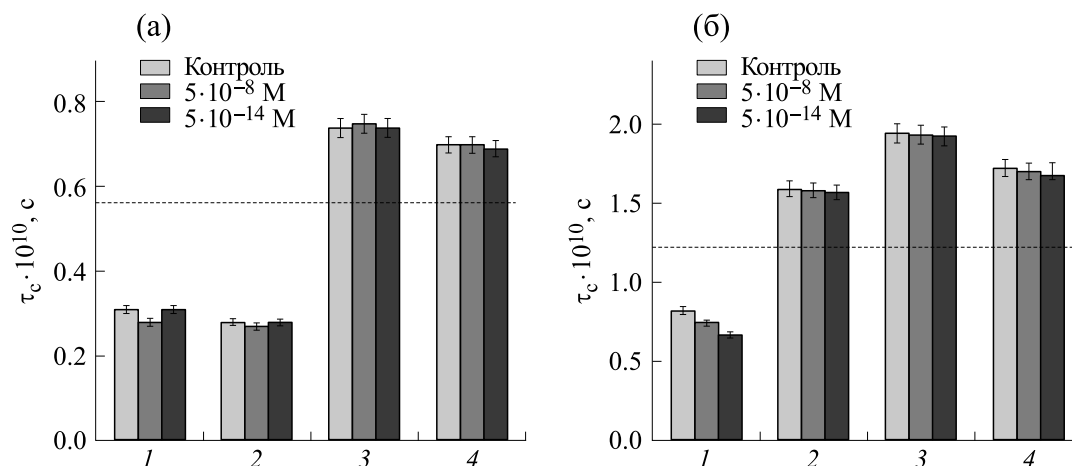


Рис. 3. Действие ресвератрола в концентрациях $5 \cdot 10^{-8}$ М и $5 \cdot 10^{-14}$ М на микровязкость мембран митохондрий при $T = 300$ К в условиях дефицита воды: (а) — липидный зонд, (б) — прибелковый зонд. Группа 1 — контроль, группа 2 — $6 \cdot 10^{-3}$ М NaHS, группа 3 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NaHS, группа 4 — $5 \cdot 10^{-6}$ М NaHS. Горизонтальная пунктирная линия соответствует микровязкости мембран митохондрий нативных растений (без внешних воздействий).

В прибелковых областях мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М, наблюдались по два термоиндуцированных структурных перехода при температурах от 12°C до 15°C ($285\text{--}288$ К) и от 30°C до 36°C ($303\text{--}309$ К) соответственно (рис. 2б). При этом в прибелковых областях липидного бислоя митохондрий при воздействии препарата в дозе $5 \cdot 10^{-6}$ М высокотемпературный переход не наблюдался, находясь, скорее всего, за пределами исследуемого интервала температур. Для всех исследованных концентраций сероводорода (рис. 2б) низкотемпературный переход ($285\text{--}288$ К) — из кристаллического в жидкокристаллическое состояние [32, 33] — лежал ниже, чем соответствующий переход для контроля ($291\text{--}297$ К). Из этого следует, что обработка семян NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М приводила к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов в прибелковых областях мембран митохондрий в сторону более низких температур относительно контроля. Сдвиг структурных переходов в область более низких температур указывает на уменьшение кристалличности липидного бислоя.

В липидных областях мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха (рис. 2а), предварительно обработанных NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М, наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от 30°C до 36°C ($303\text{--}309$ К). Подобная перестройка наблюдалась и в прибелковых областях липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М. Поэтому наи-

более вероятно, что данный термоиндуцированный переход относится к высокотемпературной перестройке. При этом низкотемпературный структурный переход «кристалл—жидкий кристалл» липидных областей мембран опытных групп с большей вероятностью находился за пределами исследуемого интервала температур (<285 К). Следовательно, обработка семян NaHS во всех трех концентрациях приводила к сдвигу обоих термоиндуцированных переходов липидных областей мембран митохондрий в область более низких температур относительно контроля.

Заметим, что все графики температурных зависимостей времен корреляции вращательной диффузии при воздействии NaHS в дозах $5 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М лежат выше, чем для контрольной группы (рис. 2а,б), что указывает на увеличение микровязкости обеих областей мембран митохондрий.

Увеличение микровязкости мембран митохондрий на фоне уменьшения их кристалличности может быть объяснено одновременным накоплением осмолитов и увеличением активности антиоксидантных ферментов при воздействии экзогенного NaHS. В работе [6] было показано, что экзогенный NaHS, так же как и эндогенный сероводород, способен увеличивать активность антиоксидантных ферментов и приводить к накоплению осмолитов. По-видимому, в нашем случае обработка семян NaHS приводила к накоплению осмолитов, например, трегалозы [20], которая способна встраиваться в мембраны [36]. Эти процессы могли привести к изменению состава мембран. В результате увеличивалась микровязкость липидного бислоя (рис. 2). Кроме того, осмолиты способны влиять на вязкостные

Таблица 1. Влияние дефицита воды и NaHS в дозе $5 \cdot 10^{-6}$ М на скорость окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха (в нг атом. О/(мин·мг белка))

Вариант	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	VFCCP
Нативные растения	21 ± 1	69 ± 2	30 ± 2	$2,27 \pm 0,01$	72 ± 4
Нативные растения + обработка семян NaHS	22 ± 2	72 ± 3	30 ± 2	$2,40 \pm 0,02$	74 ± 4
Дефицит воды (контроль)	12 ± 2	49 ± 3	29 ± 1	$1,69 \pm 0,02$	51 ± 3

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенил-гидразон). Число повторов – 7.

свойства воды [37], что также могло привести к изменению микровязкости мембран митохондрий. Увеличение активности антиоксидантных ферментов при воздействии NaHS приводило, по-видимому, к уменьшению количества АФК, что, в свою очередь, вело к накоплению ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое и тем самым к уменьшению «кристалличности» мембран митохондрий (рис. 2). Кроме того, сдвиг термоиндуцированных структурных переходов в область более низких температур может быть связан с разобщением дыхательной цепи из-за стресса. В результате разобщения дыхательной цепи локальная температура могла быть выше температуры окружающей среды за счет выделения части энергии в виде тепла. С целью проверки данного предполагаемого механизма действия экзогенного NaHS на структурные характеристики мембран было изучено влияние антиоксиданта ресвератрола на микровязкость липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха как в норме, так и при предварительной обработке семян NaHS, а также исследовано влияние дефицита воды и NaHS (H_2S) на скорость окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха.

Как видно из табл. 1, обработка семян нативных растений $5 \cdot 10^{-6}$ М раствором NaHS почти не влияет на биоэнергетические характеристики митохондрий, однако имеется тенденция к увеличению эффективности окислительного фосфорилирования (V_3/V_4). Дефицит воды имел следствием снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов по сравнению с нативными растениями, не подверженными внешним влияниям. Скорость окисления пары «глутамат + малат» в присутствии разобщителя (FCCP – карбонилцианид-*n*-трифторметок-

сифенил-гидразон) падала с 74 ± 4 до 51 ± 3 нг атом. О/(мг белка · мин). Эффективность окислительного фосфорилирования снижалась на 30%. При этом обработка семян NaHS не приводила к восстановлению биоэнергетических характеристик митохондрий до значений, характерных для нативных растений. Уменьшенная эффективность окислительного фосфорилирования (V_3/V_4) при дефиците воды как с NaHS, так и без него указывает на частичное разобщение дыхательной цепи, в результате которого часть энергии выделялась в виде тепла, что могло привести к увеличению локальной температуры.

На рис. 4 показано действие ресвератрола на структурные свойства липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха контрольной группы. Видно, что термоиндуцированные структурные переходы лишь слегка сдвинуты относительно контроля. Графики температурных зависимостей времен корреляции вращательной диффузии при белковом зонде при воздействии ресвератрола лежат частично ниже, чем для контрольной группы (рис. 4б). Этот факт указывает на то, что ресвератрол уменьшал микровязкость при белковых областей мембран митохондрий эпикотилей проростков контрольной группы гороха. Скорее всего, ресвератрол, обладая антирадикальной активностью, уменьшал реакционную способность АФК, что приводило к уменьшению окисления липидов, и, следовательно, к накоплению ненасыщенных липидов в при белковых областях мембран. Что касается липидных областей мембран, то ресвератрол практически не оказывал никакого воздействия на вязкостные свойства липидного бислоя (рис. 4а). Вероятно, это связано с тем, что АФК образуются в митохондриях преимущественно в дыхательных цепях, т.е. в при белковых областях. Поэтому действие

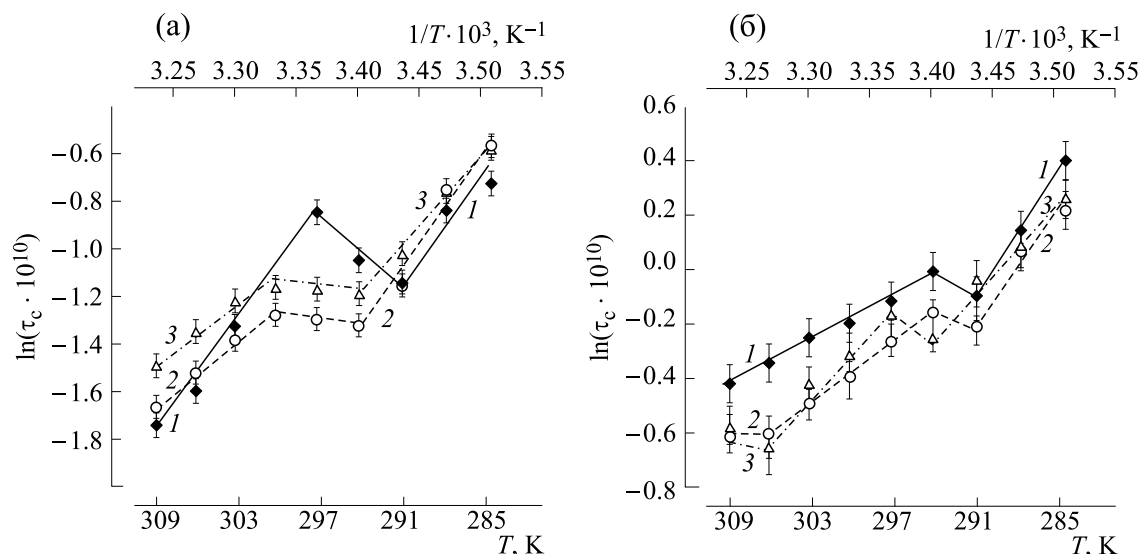


Рис. 4. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии зондов в мембране митохондрий эпикотилей проростков контрольной группы гороха, находившихся в условиях дефицита воды при воздействии ресвератрола: (а) — липидный зонд, (б) — приелковый зонд. Кривая 1 — контроль, кривая 2 — $5 \cdot 10^{-8}$ М ресвератрола, кривая 3 — $5 \cdot 10^{-14}$ М ресвератрола.

антиоксидантов сказывается в первую очередь на приелковых областях липидного бислоя.

На рис. 3 показано действие ресвератрола на микровязкость липидных и приелковых областей мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS (опытные образцы). Как видно из рис. 3, антиоксидант никак не повлиял на вязкостные свойства липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков опытных образцов гороха, вероятнее всего, из-за увеличения активности антиоксидантных ферментов под воздействием сероводорода, приводившего к сильному уменьшению количества АФК. В то же время вязкость мембран контрольной группы уменьшалась при введении антиоксиданта (рис. 3). Таким образом, вышеизложенное доказывает наше предположение о механизме действия сероводорода на структурные характеристики мембран митохондрий путем

активации антиоксидантных ферментов и одно-временного накопления осмолитов.

Отметим, что NaHS в концентрации $6 \cdot 10^{-3}$ М увеличивал микровязкость только приелковых областей мембран (рис. 2б). В то же время микровязкость липидных областей оставалась практически на уровне контроля (рис. 2а) и ниже, чем для меньших доз NaHS. Известно, что сероводород в больших концентрациях может проявлять токсичность. Например, H_2S может вступать в реакцию с жирными кислотами по двойным связям, образуя тиолы по схеме, представленной на рис. 5 [38].

В результате образования тиолов из ненасыщенных жирнокислотных хвостов, а также укорачивания некоторых хвостов липидов впоследствии липиды могли становиться намного подвижнее, что приводило к повышенным значениям текучести липидных областей мембран по сравнению с митохондриями при воздействии NaHS в меньшей дозе. Таким образом, увеличение микровязкости вследствие накопления осмолитов под воздействием NaHS с большой вероятностью компенсировалось токсичным действием большой концентрации экзогенного сероводорода. Поэтому микровязкость липидной фазы мембран оставалась практически на уровне контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обработка семян NaHS в дозах $5 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М увеличивала микровязкость на фоне уменьшения

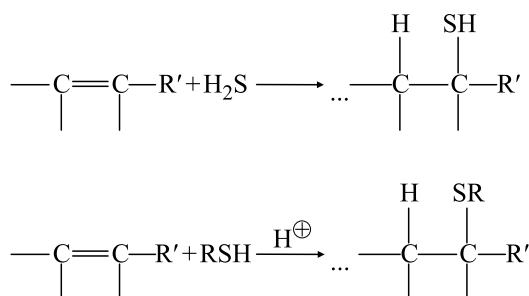


Рис. 5. Схема образования тиолов в результате реакции H_2S с жирными кислотами по двойным связям.

кристалличности обеих областей мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха. Это, по-видимому, связано с активацией накопления осмолитов, в результате чего, вероятно, уменьшался объем митохондрий, что приводило к уменьшению площади поверхности липидного бислоя, а значит, к более плотной упаковке липидов. На фоне этого воздействие NaHS приводило к активации антиоксидантных ферментов. В результате количество АФК уменьшалось. Это, в свою очередь, приводило к накоплению ненасыщенных жирных кислот, тем самым приводя к уменьшению кристалличности липидного бислоя. NaHS в концентрации $6 \cdot 10^{-3}$ М оказывал токсичное действие на структуру липидного бислоя.

В условиях дефицита воды эффективность окислительного фосфорилирования снижалась на 30%. При этом обработка семян NaHS в дозе $5 \cdot 10^{-6}$ М не приводила к восстановлению биоэнергетических характеристик митохондрий до контрольных значений. Возможно, данной концентрации недостаточно для восстановления функций митохондрий.

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. Nxele X., Klein A., and Ndimba B. K. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *S. Afr. J. Bot.*, **108**, 261–266 (2017). DOI: 10.1016/j.sajb.2016.11.003
2. Bamagoos A., Alharby H., and Fahad S. Biochar coupling with phosphorus fertilization modifies antioxidant activity, osmolyte accumulation and reactive oxygen species synthesis in the leaves and xylem sap of rice cultivars under high-temperature stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **27** (9), 2083–2100 (2021). DOI: 10.1007/s12298-021-01062-7
3. Hetherington A. M., Hunter M. I. S., and Crawford R. M. M. Contrasting effects of anoxia on rhizome lipids in *Iris* species. *Phytochemistry*, **21** (6), 1275–1278 (1982). DOI: 10.1016/0031-9422(82)80125-8
4. Abbas S. R., Ahmad S. D., Sabir S. M., and Shah A. H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **14** (1), 233–243 (2014). DOI: 10.4067/S0718-95162014005000019
5. Ma D., Ding H., Wang C., Qin H., Han Q., Hou J., Lu H., Xie Y., and Guo T. Alleviation of drought stress by hydrogen sulfide is partially related to the abscisic acid signaling pathway in wheat. *PLoS One*, **11** (9), e0163082 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0163082
6. Zhou Z.-H., Wang Y., Ye X.-Y., and Li Z.-G. Signaling molecule hydrogen sulfide improves seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under high temperature by inducing antioxidant system and osmolyte biosynthesis. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1288 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01288
7. Cheng T., Shi J., Dong Y., Ma Y., Peng Y., Hu X., and Chen J. Hydrogen sulfide enhances poplar tolerance to high-temperature stress by increasing S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity and reducing reactive oxygen/nitrogen damage. *Plant Growth Reg.*, **84** (1), 11–23 (2018). DOI: 10.1007/s10725-017-0316-x
8. Liu Z., Li Y., Cao C., Liang S., Ma Y., Liu X., and Pei Y. The role of H_2S in low temperature-induced cucurbitacin C increases in cucumber. *Plant Mol. Biol.*, **99** (6), 535–544 (2019). DOI: 10.1007/s11103-019-00834-w
9. Zhu C. Q., Zhang J. H., Sun L. M., Zhu L. F., Abliz B., Hu W. J., Zhong C., Bai Z. G., Sajid H., Cao X. C., and Jin Q. Y. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast Al contents in rice. *Front. Plant Sci.*, **9**, 294 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00294
10. Tang X., An B., Cao D., Xu R., Wang S., Zhang Z., Liu X., and Sun X. Improving photosynthetic capacity, alleviating photosynthetic inhibition and oxidative stress under low temperature stress with exogenous hydrogen sulfide in blueberry seedlings. *Front. Plant Sci.*, **11**, 108 (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00108
11. Bindu D. P., Solomon H. S., and Khosrow K. Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol.*, **38**, 101772 (2021). DOI: 10.1016/j.redox.2020.101772
12. Koch M. S. and Erskine J. M. Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *J. Ex. Mar. Biol. Ecol.*, **266** (1), 81–95 (2001). DOI: 10.1016/S0022-0981(01)00339-2
13. Koch M. S., Mendelssohn I. A., and McKee K. L. Mechanism for the hydrogen sulphide-induced growth

- limitation in wetland macrophytes. *Limnol. and Oceanogr.*, **35** (2), 399–408 (1990). DOI: 10.4319/lo.1990.35.2.0399
14. Li Z. G. Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Rus. J. Plant Physiol.*, **60** (6), 733–740 (2013). DOI: 10.1134/S1021443713060058
 15. Hancock J. T. and Whiteman M. Hydrogen sulfide signaling: interactions with nitric oxide and reactive oxygen species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1365** (1), 5–14 (2016). DOI: 10.1111/nyas.12733
 16. Huo J., Huang D., Zhang J., Fang, H., Wang B., Wang C., and Liao W. Hydrogen sulfide: a gaseous molecule in postharvest freshness. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1172 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01172
 17. Kim J. Y., Lee H. J., Jung H. J., Maruyama K., Suzuki N., and Kang H. Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Planta*, **232** (6), 1447–1454 (2010). DOI: 10.1007/s00425-010-1267-x
 18. Sadeghian S. Y. and Yavari N. Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *J. Agron. Crop Sci.*, **190** (2), 138–144 (2004). DOI: 10.1111/j.1439-037X.2004.00087.x
 19. Chen Z., Huang Y., Yang W., Chang G., Li P., Wei J., Yuan X., Huang J., and Hu X. The hydrogen sulfide signal enhances seed germination tolerance to high temperatures by retaining nuclear COP1 for HY5 degradation. *Plant Sci.*, **285**, 34–43 (2019). DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.04.024
 20. Zhao M., Liu Q., Zhang Y., Yang N., Wu G., Li Q., and Wang W. Alleviation of osmotic stress by H₂S is related to regulated PLD α 1 and suppressed ROS in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.*, **133** (3), 393–407 (2020). DOI: 10.1007/s10265-020-01182-3
 21. Christou A., Filippou P., Manganaris G. A., and Fotopoulos V. Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. *BMC Plant Biol.*, **14** (1), 42 (2014). DOI: 10.1186/1471-2229-14-42
 22. Hu L. Y., Hu S.-L., Wu J., Li Y.-H., Zheng J.-L., Wei Z.-J., Liu J., Wang H.-L., Liu Y.-S., and Zhang H. Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **60** (35), 8684–8693 (2012). DOI: 10.1021/jf300728h
 23. Li S.-P., Hu K.-D., Hu L.-Y., Li Y.-H., Jiang A.-M., Xiao F., Han Y., Liu Y.-S., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of broccoli by modulating antioxidant defense and senescence-related gene expression. *J. Agric. Food Chem.*, **62** (5), 1119–1129 (2014). DOI: 10.1021/jf4047122
 24. Yao G.-F., Wei Z.-Z., Li T.-T., Tang J., Huang Z.-Q., Yang F., Li Y.-H., Han Z., Hu F., Hu L.-Y., Hu K.-D., and Zhang H. Modulation of enhanced antioxidant activity by hydrogen sulfide antagonization of ethylene in tomato fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **66** (40), 10380–10387 (2018). DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03951
 25. Joshi N. C., Yadav D., Ratneret K., Kamara I., Aviv-Sharon E., Irihimovitch V., and Charuvi D. Sodium hydrosulfide priming improves the response of photosynthesis to overnight frost and day high light in avocado (*Persea americana* Mill, cv. 'Hass'). *Physiol. Plant.*, **168** (2), 394–405 (2020). DOI: 10.1111/pp1.13023
 26. Ni Z.-J., Hu K.-D., Song C.-B., Ma R.-H., Li Z.-R., Zheng J.-L., Fu L.-H., Wei Z.-J., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of grape by modulating the antioxidant defenses. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 4715651 (2016). DOI: 10.1155/2016/4715651
 27. Ge Y., Hu K.-D., Wang S.-S., Hu L.-Y., Chen X.-Y., Li Y.-H., Yang Y., Yang F., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest ripening and senescence of banana by antagonizing the effect of ethylene. *PLoS One*, **12** (6), e0180113 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0180113
 28. Liu D., Li J., Li Z., and Pei Y. Hydrogen sulfide inhibits ethylene-induced petiole abscission in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Hort. Res.*, **7** (1), 14 (2020). DOI: 10.1038/s41438-019-0237-0
 29. 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 спинного зонда; температурные изменения мембран бактерий. *Биохимия*, **36** (6), 1149–1155 (1971).
 30. Вассерман А. М., Бучаченко А. Л., Коварский А. Л. и Нейман М. Б. Исследование молекулярных движений в полимерах методом парамагнитного зонда. *Высокомолекуляр. соединения*, **10А** (8), 1930–1936 (1968).
 31. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1), 265–275 (1951).
 32. Комов В. П. и Шведова В. Н. *Биохимия: учебник для вузов* (Юрайт, М., 2021).
 33. 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).
 34. Герасимов Н. Ю., Неврова О. В., Жигачева И. В., Генерозова И. П. и Голощапов А. Н. Действие антиоксидантной системы «ресвератрол – серанитрозильный комплекс железа натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат» тетрагидрат на митохондрии эпикотилей проростков гороха

- in vitro*». *Биофизика*, **68** (4), 653–659 (2023). DOI: 10.31857/S000630292304004X
35. Миль Е. М., Бинюков В. И., Жигачева И. В., Албантова А. А., Фаттахов С. Г., Коновалов А. И., Заиков Г. Е. и Тунакова Ю. А. Изучение влияния стрессовых воздействий и регулятора роста растений мелафена на митохондрии проростков гороха методом АСМ. *Вестн. КНИТУ*, **16** (13), 141–144 (2013).
36. Конов К. Б. *Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны*. Дис. ... к-та физ.-мат. наук (Каз. физ.-тех. инст. им. Е. К. Завойского, Казань, 2016).
37. Ganong W. F. *Review of Medical Physiology* (McGraw-Hill Med., Minneapolis, 2005).
38. Коваль И. В. Тиолы как синтоны. *Rus. Chem. Rev.*, **62** (8), 769–786 (1993). DOI: 10.1070/RC1993v062n08ABEH000046

Hydrogen Sulfide Led to a Modification in the Structure of Mitochondrial Membrane of Epicotyls of Pea Seedlings *Pisum sativum* L. under Water Deficit Conditions

N.Yu. Gerasimov*, O.V. Nevrova*, I.V. Zhigacheva*, 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

The present study has been carried out to investigate changes in the structural characteristics of mitochondrial membranes isolated from epicotyls of pea seedlings of variety Nemchinovskiy 100 under the influence of different concentrations of NaHS. It was shown that treatment of pea seeds with NaHS at doses of $2 \cdot 10^{-4}$ and $5 \cdot 10^{-6}$ M resulted in the shift of thermally-induced structural transitions toward the region of lower temperatures and an increase in the microviscosity of both lipid and preprotein regions of mitochondrial membrane due to a decrease in the volume of their crystallization matrix. The presence of exogenous NaHS or endogenous hydrogen sulfide can enhance the activity of antioxidant defense enzymes and lead to accumulation of osmolytes. As a result, the microviscosity of the lipid bilayer could increase. To test this hypothesis, the effect of resveratrol, an antioxidant agent, on microviscosity of the lipid bilayer of epicotyl mitochondria of pea seedlings was investigated using normal pea seeds treated with resveratrol with or without pre-treatment with NaHS. Additionally, bioenergetic characteristics of mitochondria were studied. The results obtained confirmed that hydrogen sulfide has an effect on the structural characteristics of mitochondrial membranes through the activation of antioxidant enzymes and accumulation of osmolytes.

Keywords: membrane structure, mitochondria, membrane microviscosity, pea seedlings, water deficit, hydrogen sulfide