

УДК 581.17:577.352.4:577.125.36

## ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПРОСТАНОИДОВ НА $\text{Ca}^{2+}$ -ПРОНИЦАЕМЫЕ КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Е.М. Лапковская, Г.Г. Филипцова, А.И. Соколик, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

### Введение

Фитопростаны – вещества, синтезируемые растениями из  $\text{C}_{18}$ -полиненасыщенных жирных кислот, через неферментативный, катализируемый свободными радикалами путь. Эти соединения относят к группе оксипинов, которая включает в себя продукты окислительного метаболизма полиеновых жирных кислот независимо от их структурных особенностей и длины цепи ( $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_{20}$  и другие). Оксипины не только являются сигнальными медиаторами при передаче преобразованной информации к геному клетки, но и выполняют ряд других функций [1]. Так, была показана роль оксипинов как биорегуляторов, корректирующих действие фитогормонов при стрессе различной природы [2]. Установлено влияние оксипинов на синтез вторичных метаболитов [3]. Отмечено, что оксипины являются элиситорами и образуются в клетках растений в местах инфицирования, вызывая экспрессию «защитных» генов, синтез соответствующих белков, образование фитоалексинов и, в конечном итоге, способствуют формированию иммунитета растений к патогенам [2, 3, 4]

Являясь элиситорами, оксипины могут изменять в цитоплазме концентрации целого ряда ионов, включая кальций и хлор, поступая как из внутриклеточных компартментов, так и из внеклеточной среды [5]. Считается, что изменение концентрации кальция в цитоплазме может играть роль интермедиата в сигнальной системе, индуцируя синтез сигналзависимых белков [1].

Таким образом, согласно современным представлениям, оксипины являются важным классом сигнальных молекул, которые вызывают экспрессию генов, позволяющих растению адаптироваться к действию как биотических, так и абиотических факторов среды [2].

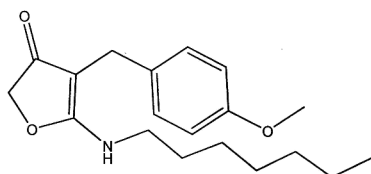
Все нативные простаноиды характеризуются широким спектром биологических эффектов и краткосрочностью действия в связи с их невысокой стабильностью. Стабильность этих соединений можно повысить путем химической модификации отдельных участков молекулы, не меняющей ее стереоспецифичность [6, 7]. Однако структурная особенность молекул простаноидов такова, что любые модификации ее структуры изменяют спектр биологического действия. Причем, в ряде случаев образующиеся соединения обладают более сильным физиологическим действием, чем природные, а в других случаях, наоборот, их активность резко снижается.

Согласно литературным данным, некоторые оксипины могут оказывать влияние на транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через плазмалемму растительной клетки [8], а некоторые гидропероксипроизводные полиеновых жирных кислот способны выступать в роли кальциевых ионофоров [5]. Скрининг синтетических производных простаноидов с измененной структурой открывает неограниченные возможности выбора аналогов простаноидов с селективным действием на те или иные системы, органы, процессы. Для понимания механизма проявления биологической активности синтетических производных простаноидов важное значение имеет изучение механизма их взаимодействия с мембранными структурами, в частности, влияние на функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны растительной клетки.

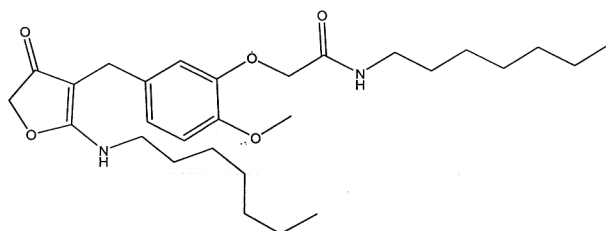
Учитывая функции простаноидов и роль кальция в сигналинге растений представлялось целесообразным исследовать действие синтетических аналогов простаноидов на функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*.

**Методы исследования**

Исследовалась биологическая активность трех синтетических оксилипинов, синтезированных в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и относящихся к простаноидам группы В. Было изучено влияние 5-(Гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-она (П1), N-Гептил-2-{5-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метоксифенокси}ацетамида (П2) и (*E*)-Метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидрофуран-2-иламино)гексаноата (П3) в диапазоне концентраций от  $10^{-5}$  до  $10^{-7}$  моль/л на функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазмалеммы растительной клетки (рисунок 1).



5-(Гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-он (П1)



N-Гептил-2-{5-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метоксифенокси} ацетамид (П2)

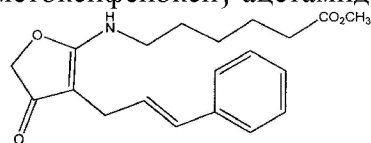
*E*-Метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидрофуран-2-иламино)гексаноат (П3)

Рисунок 1 – Структурные формулы исследованных синтетических аналогов простаноидов

В качестве объектов исследования служили интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis*. Данный объект является удобной моделью для регистрации функционирования транспортных систем плазматической мембраны [9].

Использованная в настоящей работе культура водоросли выращивалась в лабораторных условиях в среде следующего состава (моль/л):  $10^{-4}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $4 \cdot 10^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-3}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $10^{-4}$   $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , pH 7,2. Обеспечивался постоянный цикл освещения – 12 часов свет/12 часов темнота.

Базовым раствором в экспериментах с *Nitella flexilis* служил раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава (моль/л):  $10^{-4}$   $\text{KCl}$ ,  $10^{-3}$   $\text{NaCl}$ ,  $10^{-4}$   $\text{CaCl}_2$ , значения pH которого поддерживалось с помощью буферной системы ТРИС-НСI на уровне  $7,0 \pm 0,1$ .

Для электрофизиологических экспериментов отбирали вторую или третью интернодальные клетки, которые выдерживались в темноте в течение 1–2 суток для деактивации светостимулируемой электрогенной  $\text{H}^+$ -АТФазной помпы.

При изучении мембранотропного действия различных химических соединений важное значение имеет прижизненный контроль наблюдаемых эффектов *in vivo*. В настоящей работе это достигается использованием микроэлектродной техники. Эксперименты проводились в режиме фиксации напряжения на плазмалемме [9, 10]. Фиксацию потенциала осуществляли на уровне -160 мВ, после чего регистрировали токовые кривые при подаче импульсов деполяризующего напряжения, возрастающего с шагом 10 мВ длительностью до 2 сек (рисунок 2). Интервалы между импульсами составляли 7 минут. На основании пиковых значений токов строились вольт-амперные характеристики каналов и их активационные

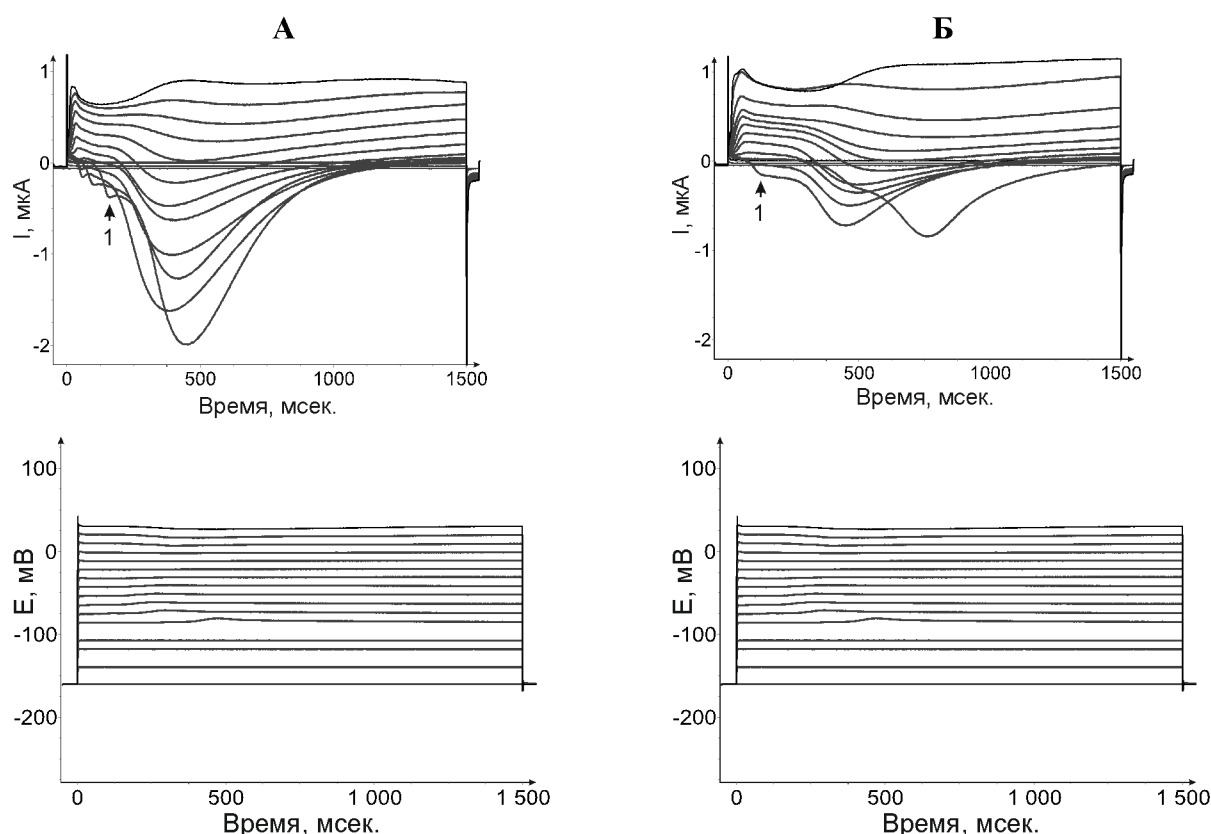
кривые, представляющие собой зависимости проводимости мембраны в момент наибольшего значения тока от напряжения на плазмалемме.

Скорость циклоза измеряли визуально под микроскопом с использованием окуляр-микрометра.

Исследуемые параметры регистрировались в контрольных растворах (ИПВ) и после добавления соответствующей концентрации простаноидов. Повторность опытов 5–7-кратная.

### Результаты и обсуждение

Регистрируемые токовые кривые, по которым, как отмечено, строились вольт-амперные характеристики, позволяли выявить сдвиги в свойствах исследуемых каналов под действием простаноидов. Пример токовых кривых в контрольном растворе в присутствии простаноида приведен на рисунке 2.



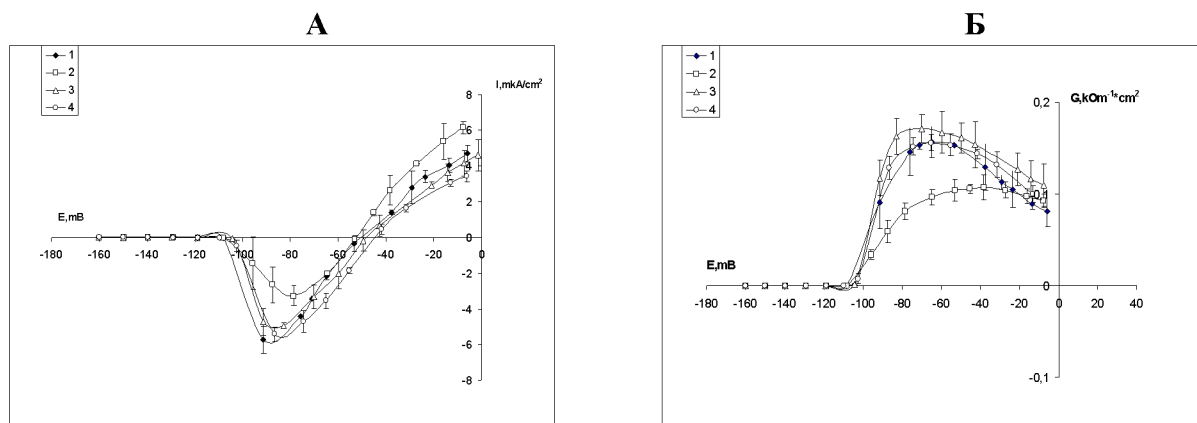
А – контроль, Б – в присутствии простаноида 1 в концентрации  $10^{-6}$  моль/л

Рисунок 2 – Типичные токовые кривые плазмалеммы клеток *Nitella flexilis*

Примечание. Стрелкой отмечены пиковые значения кальциевых токов.

На рисунке 3 представлены вольт-амперные характеристики и активационные кривые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны в контроле и после 20-минутной экспозиции в растворе П1 в концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  моль/л. Установлено, что исследованный простаноид оказывал заметное влияние на функционирование кальциевых каналов лишь в концентрации  $10^{-5}$  моль/л. Согласно полученным данным, под действием П1 наблюдается уменьшение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -тока, а также уменьшение максимальной проводимости кальциевых каналов 1,5–2 раза. С другой стороны, его воздействие не сопровождалось изменением порога активации каналов, однако при этом отмечалось снижение крутизны восходящего участка активационной кривой. Изменение величины потенциала реверсии при действии вещества в концентрации  $10^{-5}$  моль/л не наблюдалось. Таким образом, анализ модификации активационных кривых позволяет заключить, что П1 в концентрации  $10^{-5}$  моль/л подавляет

функциональную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. С уменьшением концентрации действующего вещества значительных эффектов не наблюдается.



- 1 – контроль, 2 – при добавлении простаноида П1 в концентрации  $10^{-5}$  моль/л,  
 3 – при добавлении простаноида П1 в концентрации  $10^{-6}$  моль/л,  
 4 – при добавлении простаноида П1 в концентрации  $10^{-7}$  моль/л.

Рисунок 3 – Стационарные вольт-амперные характеристики (А) и активационные кривые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Б)

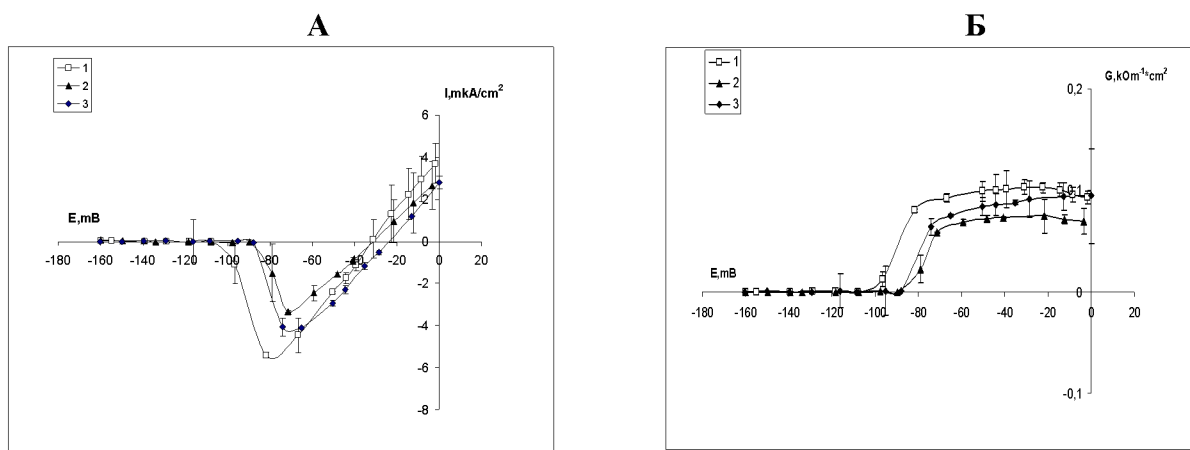
Изменение наклона активационной кривой в присутствии простаноида 1 в концентрации  $10^{-5}$  моль/л, может свидетельствовать о его взаимодействии с воротным механизмом канала, а снижение проводимости говорит об уменьшении числа открытых каналов.

Анализ данных о характере влияния П2 на функциональную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* позволил установить, что он оказывал влияние в концентрациях  $10^{-6}$  моль/л и  $10^{-7}$  моль/л (рисунок 4). В обоих случаях П2 индуцировал уменьшение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -тока примерно в 1,2–1,5 раза и соответственное уменьшение проводимости  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Положение активационной кривой по оси напряжения изменялось: происходил ее сдвиг по оси напряжений в сторону деполяризации на 20 мВ для обеих концентраций. При этом более выраженный эффект наблюдался при действии П2 в концентрации  $10^{-6}$  моль/л. Увеличение концентрации действующего вещества до  $10^{-5}$  моль/л не привело к изменению исследуемых параметров. Все это означает, что зарегистрированный сдвиг не является результатом снижения величины поверхностного потенциала, а скорее свидетельствует о модификации потенциалчувствительного сенсора воротного механизма канала [10].

Наблюдаемые смещения потенциала реверсии тока по оси напряжения (рисунок 4) при одновременном снижении проводимости означают изменение ионной избирательности каналов, что возможно является результатом взаимодействия П2 с селективным фильтром канала.

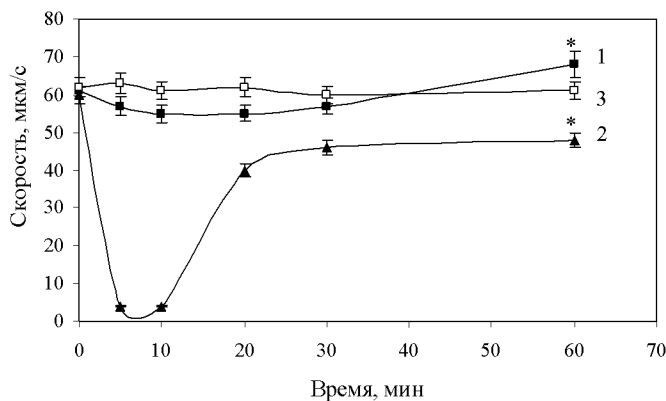
Исследование биологической активности синтетического П3 показало, что данный простаноид во всех испытуемых концентрациях ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  моль/л) не оказывает достоверного влияния на функциональную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Известно, что в растительных клетках, в зависимости от цитоплазматической концентрации, кальций индуцирует или вызывает остановку скорости движения цитоплазмы, а, как показано выше, простаноиды влияют на свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. В этой связи нами исследовались закономерности влияния простаноидов на скорость движения цитоплазмы (циклоз) клеток *Nitella*. Кривые изменения скорости циклоза под действием трех исследованных аналогов простаноидов в концентрации  $10^{-5}$  моль/л представлены на рисунке 5.



1 – контроль, 2 – в присутствии простаноида П2 в концентрации  $10^{-6}$  моль/л,  
3 – в присутствии простаноида П2 в концентрации  $10^{-7}$  моль/л.

Рисунок 4 – Стационарные вольт-амперные характеристики (А) и активационные кривые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Б)



1 – при добавлении простаноида П1, 2 – при добавлении простаноида П2,  
3 – при добавлении простаноида П3

Рисунок 5 – Изменение скорости циклоза клеток *Nitella flexilis* во времени под влиянием синтетических аналогов простаноидов в концентрации  $10^{-5}$  моль/л

\* – различия между вариантами достоверны при  $P \leq 0,05$ .

Как и в случае с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами, П3 не оказывал достоверного влияния на скорость циклоза клеток *Nitella flexilis*, тогда как П1 и П2 вызывали заметные сдвиги, особенно в первые десять минут. Установлено, что простаноид П2 уже через 5 минут после внесения в раствор ИПВ вызывал резкое снижение скорости циклоза вплоть до его остановки. Увеличение времени экспозиции клетки в экспериментальном растворе приводило к возобновлению циклоза, однако его скорость на 20–25% была ниже исходного значения. Простаноид П1 оказывал менее выраженное действие, при 10–20 минутной экспозиции клеток в растворе простаноида скорость циклоза снижалась примерно на 10% по сравнению с исходным значением. Однако при увеличении времени экспозиции клеток до 60 минут происходил рост скорости циклоза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что исследованные простаноиды оказывают различное влияние на скорость движения цитоплазмы растительных клеток, что может быть связано с различным механизмом их действия на кальциевые каналы. Согласно существующим представлениям [11], изменение цитоплазматической концентрации кальция влияет на актиновые микрофиламенты, определяющие свойства и характер движения цитоплазмы.

На основании полученных закономерностей становится очевидным, что испытанные синтетические аналоги простаноидов обладают различным механизмом действия на  $\text{Ca}^{2+}$ -

каналы плазматической мембраны, что оказывает влияние на скорость циклоза, а следовательно, и функциональное состояние растительной клетки.

### Выводы

Полученные экспериментальные данные позволили установить различный механизм действия синтетических аналогов простаноидов 5-(Гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-она, N-Гептил-2-{5-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метоксифенокси}ацетамида и (E)-Метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидро-фуран-2-иламино)гексаноата на функциональную активность потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов плазматической мембраны и характер скорости циклоза клетки *Nitella flexilis*. Установлено, что 5-(Гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-он и N-Гептил-2-{5-[(2-(гептил-амино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метоксифенокси}ацетамид изменяют проводимость кальциевых каналов, что отражается на функциональном состоянии растительной клетки. Тогда как (E)-Метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидро-фуран-2-иламино)гексаноат не оказывает существенного влияния на исследуемые параметры.

### Список литературы

1. Гречкин, А.Н. Сигнальные системы клеток и геном / А.Н. Гречкин, И.А. Тарчевский // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26, № 10. – С. 779–781.
2. New bioactive oxylipins formed by nonenzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes / T. Durand [et al.] // Lipids. – 2009. – Vol. 10. – P. 875–888.
3. Loeffler, C. B<sub>1</sub>-Phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses / C. Loeffler, S. Berger, A. Guy // Plant Physiology. – 2005. – Vol. 1. – P. 328–340.
4. Гречкин, А.И. Липоксигеназная сигнальная система / А.И. Гречкин, И.А. Тарчевский // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 1. – С. 132–142.
5. Тарчевский, И.А. Влияние элиситоров на ионные потоки и электрические потенциалы растений / И.А. Тарчевский // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 2. – С. 321–331.
6. Простагландины / Под ред. Н.С. Ажгихина. – М.: Медицина, 1978. – 416 с.
7. Лахвич, Ф.А. Биорегуляторы: лечебные и диагностические препараты. Химические средства защиты растений / Ф.А. Лахвич // Наука – народному хозяйству. – Минск, 2002. – С. 611–641.
8. Qing-peng Sun [et al.] // Plant Growth Regul. – 2009. – Vol. 57. – P. 7–13.
9. Юрин, В.М. Перенос ионов через мембраны растительных клеток / В.М. Юрин, М.Н. Гончарик, С.Г. Галактионов. – Минск, 1977.
10. Юрин, В.М. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток / В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов. – Минск, 1991.
11. Альбертис, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертис, Д. Брей, Дж. Льюис. – М.: Мир, 1994.

## INFLUENCE OF SYNTHETIC ANALOG PROSTANOIDS ON $Ca^{2+}$ -CHANNELS OF PLANT CELL PLASMALEMMA

E.M. Lapkovskaya, H.G. Filiptsova, A.I. Sokolik, V.M. Yurin  
Belarusian State University, Minsk, Belarus

Important role in regulation of biochemical and physiological processes of plant cell belongs to prostanoids, which are products of non-enzymatic lipid peroxidation. Biological activity of three synthetic analog prostanoids, which are B group prostaglandins: 5-(heptylamino)-4-(4-methoxybenzyl)furan-3(2H)-one, N-heptyl-2-{5-[(2-(heptylamino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl)-methyl]-2-methoxyphenoxy}acetamide and (E)-methyl-6-(3-cinnamyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-2-ylamino)hexanoate, on functional activity of  $Ca^{2+}$ -channels have been studied. It was shown that 5-(heptylamino)-4-(4-methoxybenzyl)furan-3(2H)-one and N-heptyl-2-{5-[(2-(heptylamino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl)-methyl]-2-methoxyphenoxy}acetamide modify of  $Ca^{2+}$ -channels conductivity and rate of *Nitella flexilis* cycloses. Thus (E)-methyl-6-(3-cinnamyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-2-ylamino)hexanoate don't exercise influence on studied parameters.