Краткие сообщения

Short communications

УДК 577.13

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭМОДИНА НА РАСТЕНИЯ

А. И. КОХАНОВСКИЙ [1)]***, В. М. ЮРИН*** [2)]***, Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ*** [3)]

[1)]*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2В, 220012, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[3)]*Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь*

Эмодин, являющийся вторичным метаболитом многих растений, обладает широким спектром биологического действия на различные группы организмов, однако механизмы его воздействия на растения практически не изучены. Существует предположение, что эмодин может играть определенную роль в аллелопатии, попадая в почву с опавшими листьями. Цель исследования – установить влияние эмодина на ростовые процессы и гемсодержащие ферменты. Проведенные эксперименты показали, что он оказывает ингибирующий эффект на корневую систему *Allium cepa*, а также способствует инициации каталазной активности в корнях, при этом *in vitro* активность фермента каталазы под действием эмодина снижается. Выявлен возможный механизм инактивации фермента – взаимодействие эмодина с гемом. Дальнейшая детализация биологического действия эмодина позволит расширить сферы его применения в защите растений, растениеводстве, а также определить роль данного соединения в экологии и физиологии растений.

Ключевые слова: эмодин; аллелопатия; вторичные метаболиты растений; *Frangula*; Rhamnaceae.

Образец цитирования:
Кохановский АИ, Юрин ВМ, Кохановская ЕЮ. Некоторые аспекты биологического действия эмодина на растения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;2:97–103.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-97-103

For citation:
Kakhanouski AI, Yurin VM, Kakhanouskaya KYu. Some aspects of biological effect of emodin on plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;2:97–103. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-97-103

Авторы:
Александр Иванович Кохановский – аспирант лаборатории прикладной биохимии отдела биохимии и биотехнологии растений. Научные руководители – кандидат биологических наук Е. В. Спиридович, В. М. Юрин.
Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.
Екатерина Юрьевна Кохановская – ассистент кафедры общей химии факультета профориентации и довузовской подготовки.

Authors:
Aliaxandr I. Kakhanouski, postgraduate student at the laboratory of applied biochemistry, department of biochemistry and plant biotechnology.
a.kakhanouski@yandex.by
https://orcid.org/0000-0002-5643-2254
Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of cell biology and plant bioengineering, faculty of biology.
yurin@bsu.by
Katsiaryna Yu. Kakhanouskaya, assistant at the department of general chemistry, faculty of career guidance and pre-university training.
e.kohanovskaya@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-2298-1765

CC BY NC

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:97–103
Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;2:97–103

SOME ASPECTS OF BIOLOGICAL EFFECT OF EMODIN ON PLANTS

A. I. KAKHANOUSKI[a], *V. M. YURIN*[b], *K. Yu. KAKHANOUSKAYA*[c]

[a]*Central Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus, 2B Surhanava Street, Minsk 220012, Belarus*
[b]*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[c]*Belarusian State Medical University, 83 Dziaržynskaha Avenue, Minsk 220116, Belarus*

Corresponding author: A. I. Kakhanouski (a.kakhanouski@yandex.by)

Emodin, a secondary metabolite of many plants, has a wide spectrum of biological action on various groups of organisms, but the mechanisms of its action on plants are practically not studied. There is an assumption that emodin plays a certain role in allelopathy, getting into the soil with fallen leaves in the form of glycosides, which break down into emodin aglycones and are stored in the ecosystem. The aim of the study was to establish the effects of emodin on growth processes and its effect on heme-containing enzymes. It was found that emodin has an inhibitory effect on the root system of *Allium cepa*, and also promotes the activation of catalase activity in the roots. When studying the direct action of emodin on the activity of the catalase enzyme *in vitro*, it was found that the activity of the catalase enzyme decreases under the action of emodin. When studying the possible mechanisms of inactivation, it was found that emodin can interact with heme. Further detailing of the patterns of biological action of emodin will expand the scope of its application in plant protection, crop production, and also determine its role in plant ecology and physiology.

Keywords: emodin; allelopathy; plant secondary metabolites; *Frangula*; Rhamnaceae.

Введение

Эмодин (6-метил-1,3,8-тригидроксиантрахинон) является вторичным метаболитом многих растений. В частности, это соединение в виде гликозидов обнаружено во всех органах представителей рода крушины (*Frangula*, Rhamnaceae), но у разных видов в разных соотношениях. Кора крушины содержит около 8 % антрахинонов, среди которых преобладают гликозиды эмодина [1, с. 85–87].

На лабораторных животных и культурах клеток млекопитающих достаточно хорошо исследовано биологическое действие эмодина, а именно его фармакологические и токсические эффекты. Так, по токсикологической номенклатуре эмодин – это среднетоксичное соединение, однако функции этого вещества для самого растения и его действие на другие растения мало изучены.

Поскольку эмодин обладает токсичностью, возникло предположение, что данный метаболит играет определенную роль в аллелопатии, так как попадает в почву с опавшими листьями в виде гликозидов. В результате физических и биологических процессов гликозиды распадаются на агликоны эмодина, которые стабильно сохраняются в экосистеме. Являясь активной формой, агликоны ингибируют рост проростков близлежащих растений. В ходе экспериментов было установлено, что эмодин подавлял рост проростков салата (*Lactuca sativa*), зеленого амаранта (*Amaranthus viridis*) и травы тимофеевки (*Phleum pratense*) [2]. Так, при концентрации 0,005 % эмодин сильно замедлял рост рассады салата, а при концентрации более 0,01 % ингибировал рост корней и гипокотилей. Эмодин в дозах 10–100 мг/л подавлял рост корней и побегов подсолнечника (*Helianthus annuus*) (LD_{50} – 45 мг/л) и кукурузы (*Zea mays* var. *everte*) (LD_{50} – 65 мг/л). Следует отметить, что эмодин оказывал влияние и на всхожесть семян. К примеру, после применения эмодина в дозах 50 и 100 мг/л всхожесть семян подсолнечника с 98 % снизилась до 76 и 55 % соответственно [3].

Согласно исследованию *in silico* [4] эмодин способен образовывать соединения не только с белками, но и с гемом. Таким образом, одним из возможных механизмов биологического действия эмодина может быть его взаимодействие с гемопротеинами, такими как цитохромы, пероксидазы, каталазы.

Несмотря на то что эмодин обладает широким спектром биологического действия на различные группы организмов, сами механизмы его воздействия на растения практически не изучены.

Цель исследования – установить биологическое действие эмодина на модельном организме луке репчатом (*Allium cepa*).

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали эмодин (code: 117755000, lot: A0348291, CAS: 518-82-1) компании *Acros Organics* (Бельгия). Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Solar PV 1211 (Беларусь). Коэффициент молярного поглощения эмодина определяли в 0,2 моль/л фосфатном буферном растворе (ФБР) с pH 7,4.

Агликон эмодина практически нерастворим в воде, по этой причине приготовили коллоидный раствор эмодина методом химической конденсации. Для этого эмодин растворили в 0,1 моль/л гидроксиде натрия с образованием фенолята эмодина. Затем полученный раствор добавили в ФБР (pH 7,4) в соотношении 12 : 100, такое соотношение не приводит к сдвигу pH. В итоге гидроксид натрия нейтрализовался буферным раствором, а фенолят эмодина преобразовался в эмодин, который конденсировался с образованием коллоидного раствора с концентрацией эмодина $1{,}586 \cdot 10^{-4}$ моль/л. В данный раствор поместили часть пророщенных луковиц, контрольные луковицы погрузили в ФБР, интактные – в воду. Через 5 дней измерили массу корней по методике аллиум-теста [5].

Активность каталазы определяли методом Баха и Опарина [6, с. 44–47].

В качестве модельного гемопротеина использовали гемоглобин. В эксперименте к раствору гемоглобина с концентрацией $1{,}796 \cdot 10^{-4}$ моль/л последовательно добавляли раствор эмодина с концентрацией $1{,}586 \cdot 10^{-4}$ моль/л и снимали спектр поглощения.

Статистическую обработку результатов проводили в программе *Statistica 10*. Для прямой при определении коэффициента молярного поглощения был получен 99,83 % порог значимости. Различия между двумя независимыми выборками оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни ($n = 3–6$ при $\alpha = 0{,}05$).

Результаты и их обсуждение

При изучении токсического действия веществ на модельном организме *Allium cepa* хорошим макропоказателем является прирост корневой системы, так как любое нарушение биологических функций клеток приводит к снижению прироста растений (рис. 1).

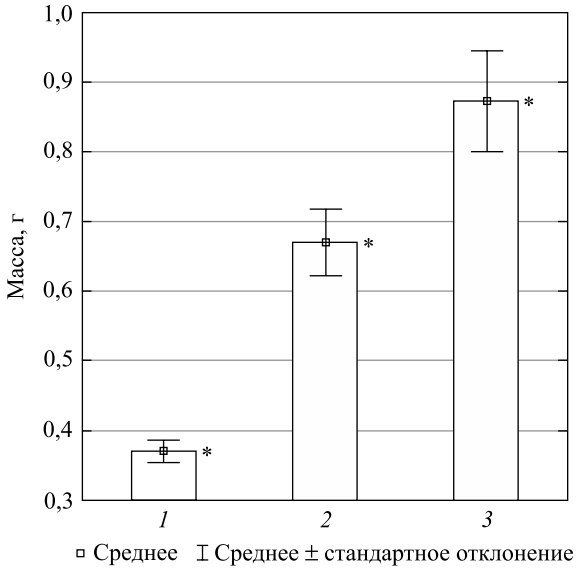

Рис. 1. Действие эмодина на массу корней в аллиум-тесте:
1 – луковицы в растворе эмодина; *2* – луковицы в ФБР; *3* – луковицы в воде;
* – различия между выборками ($n = 5$) статистически значимы
($p = 0{,}003\,1$, дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса)

Fig. 1. The effect of emodin on the mass of roots in the allium test:
1 – bulbs in emodin solution; *2* – bulbs in phosphate buffered saline; *3* – bulbs in water;
* – differences between samples ($n = 5$) are statistically significant
($p = 0.003\,1$, Kruskal – Wallis analysis of variance)

Из рис. 1 видно, что масса корней лука в растворе эмодина почти в 3 раза меньше, чем в воде. Исходя из этого, можно сделать вывод, что эмодин оказывает ингибирующее действие на корневую систему лука.

Как известно, эмодин, обладая липофильными свойствами, способен преодолевать плазматические мембраны, а также, согласно базе данных токсических веществ *The Toxin and Toxin Target Database* (T3DB), может ингибировать цепи переноса электронов с образованием активных форм кислорода, это, в свою очередь, приводит к активации антиоксидантной системы. Кроме того, в ответ на чужеродные вещества в растительных клетках активируются биохимические системы трансформации веществ, при этом образуются активные формы кислорода и пероксид водорода. Пероксид водорода индуцирует экспрессию генов, участвующих в регулировании окислительного стресса [7], что приводит

к увеличению каталазной активности в клетках. Следовательно, каталазная активность в тканях как биохимический показатель хорошо отражает физиологическое состояние растительного организма.

С этой целью определено изменение каталазной активности в тканях корней лука, находившихся в растворе эмодина (рис. 2).

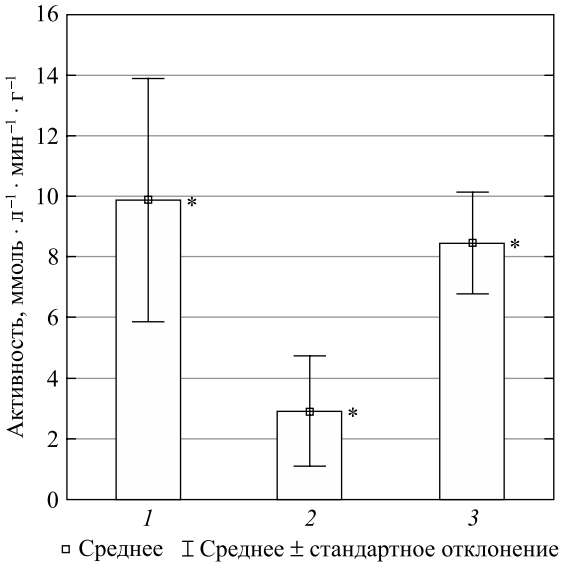

Рис. 2. Действие эмодина на каталазную активность в тканях корней лука:
1 – луковицы в растворе эмодина; *2* – луковицы в ФБР; *3* – луковицы в воде;
* – различия между выборками ($n = 5$) статистически значимы
($p = 0{,}010\,6$, дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса)

Fig. 2. Effect of emodin on catalase activity in onion root tissues:
1 – bulbs in emodin solution; *2* – bulbs in the phosphate buffered saline; *3* – bulbs in water;
* – differences between samples ($n = 5$) are statistically significant
($p = 0.010\,6$, Kruskal – Wallis analysis of variance)

Как видно из рис. 2, наибольшая каталазная активность наблюдается в тканях корней, имевших контакт с эмодином. Она почти на 70 % превышает каталазную активность корневой системы луковиц, помещенных в ФБР, и на 20 % – луковиц, помещенных в воду (отличия статистически значимы, $n = 5$, $p = 0{,}010\,6$). Можно предположить, что высокая концентрация ионов натрия в ФБР способствовала снижению каталазной активности в корнях контрольной группы. В то же время эмодин инициировал каталазную активность в корнях. Это явление можно объяснить тем, что эмодин обладает свойством ингибирования цепи переноса электронов и способствует образованию активных форм кислорода, а это активирует антиоксидантную систему клеток.

Поскольку имеются сведения, что эмодин может взаимодействовать с белками и гемом, было проведено исследование, позволяющее судить о способности эмодина инактивировать гемсодержащие ферменты *in vitro* (рис. 3).

Активность фермента каталазы под действием эмодина снижается, что указывает на способность эмодина инактивировать фермент *in vitro* (см. рис. 3).

Как показали эксперименты с корешками лука, эмодин активирует антиоксидантную систему, о чем можно судить по увеличению каталазной активности в тканях. Однако *in vitro* эмодин снижает активность каталазы. Эта, на первый взгляд, парадоксальность может иметь вполне логичное объяснение. В эксперименте с корешками лука молекулы эмодина, проникая в клетки, опосредованно запускают антиоксидантную систему, кроме того, часть молекул эмодина могут прореагировать с большим числом молекул плазматической мембраны или цитоплазмы, что уменьшает вероятность взаимодействия с молекулами каталазы, чтобы инактивировать этот фермент.

Для определения возможности взаимодействия эмодина с гемом *in vitro* в качестве доступной модели использовали гемсодержащий белок гемоглобин.

Сначала определили максимум поглощения для коллоидного раствора эмодина в ФБР (рис. 4).

Как видно из рис. 4, максимум поглощения у эмодина в ФБР при разных концентрациях наблюдается при 480 нм.

Затем к растворенному в ФБР гемоглобину с концентрацией $1{,}796 \cdot 10^{-4}$ моль/л последовательно добавляли раствор эмодина с концентрацией $1{,}586 \cdot 10^{-4}$ моль/л и снимали спектры (рис. 5).

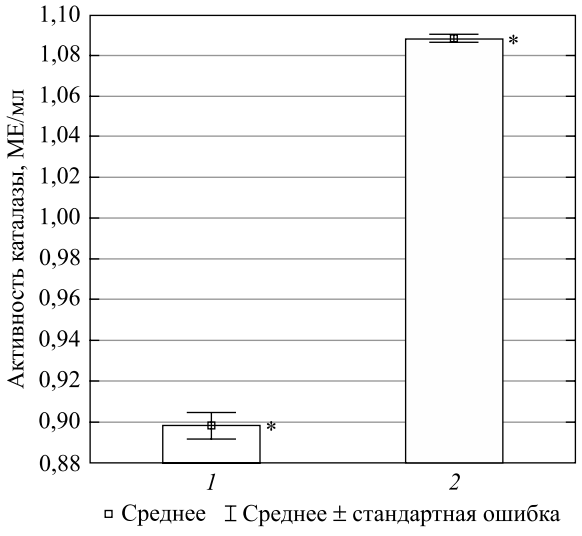

Рис. 3. Действие эмодина на активность каталазы *in vitro*:
1 – каталаза с эмодином; *2* – каталаза без эмодина;
* – различия между выборками ($n_1 = 4$, $n_2 = 4$) статистически значимы
($p = 0{,}028\,571$, тест Манна – Уитни)

Fig. 3. Effect of emodin on catalase activity *in vitro*:
1 – catalase with emodin; *2* – catalase without emodin;
* – differences between samples ($n_1 = 4$, $n_2 = 4$) are statistically significant
($p = 0.028\,571$, Mann – Whitney test)

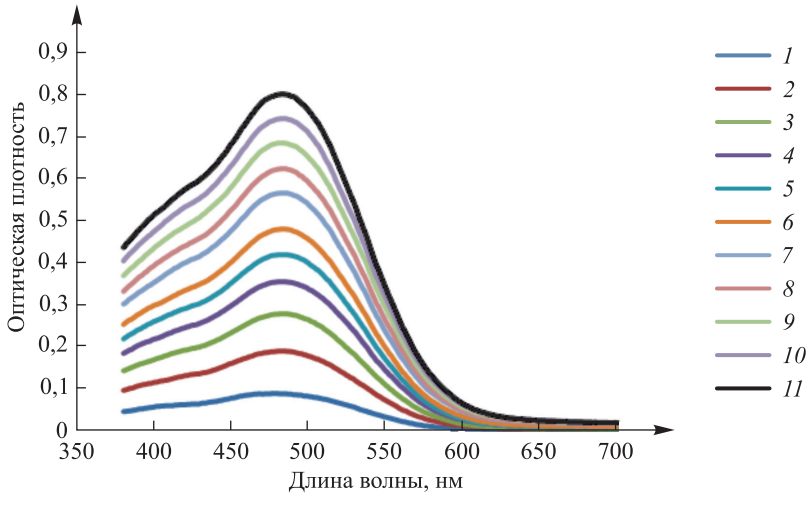

Рис. 4. Спектры поглощения эмодина при его разных концентрациях в ФБР
($\times 10^{-4}$ моль/л): *1* – 0,007 93; *2* – 0,015 85; *3* – 0,023 79; *4* – 0,031 72;
5 – 0,039 65; *6* – 0,047 58; *7* – 0,055 51; *8* – 0,063 44; *9* – 0,071 37; *10* – 0,079 3; *11* – 0,087 23

Fig. 4. Light absorption spectra of emodin at different concentrations in phosphate buffered saline
($\times 10^{-4}$ mol/L): *1* – 0.007 93; *2* – 0.015 85; *3* – 0.023 79; *4* – 0.031 72; *5* – 0.039 65;
6 – 0.047 58; *7* – 0.055 51; *8* – 0.063 44; *9* – 0.071 37; *10* – 0.079 3; *11* – 0.087 23

Как видно из рис. 5, с каждым добавлением эмодина увеличивается оптическая плотность в области 480 нм, что указывает на рост концентрации эмодина. При этом концентрация гемоглобина снижалась, следовательно, должна была уменьшиться и оптическая плотность при 414 нм, так как это максимум поглощения гема, но оптическая плотность раствора при этой длине волны увеличивалась с каждым добавлением раствора эмодина.

Максимум поглощения в области 414 нм относится к так называемой полосе Соре, которая характерна для всех тетрапиррольных макроциклов, в том числе гема, независимо от того, является он простетической группой или находится в свободном виде. При этом любые физико-химические преобразования тетрапиррольных макроциклов (например, депротонизация) приводят к изменениям оптической плотности в области Соре [8]. Таким образом, в нашем эксперименте наблюдается взаимодействие эмодина с гемом, однако мы не располагаем данными, чтобы с уверенностью указать на физико-химическую природу этого взаимодействия.

Для установления характера зависимости изменений оптической плотности от концентрации эмодина проведен регрессионный анализ и определены коэффициенты линейной регрессии и их статистическая значимость (рис. 6).

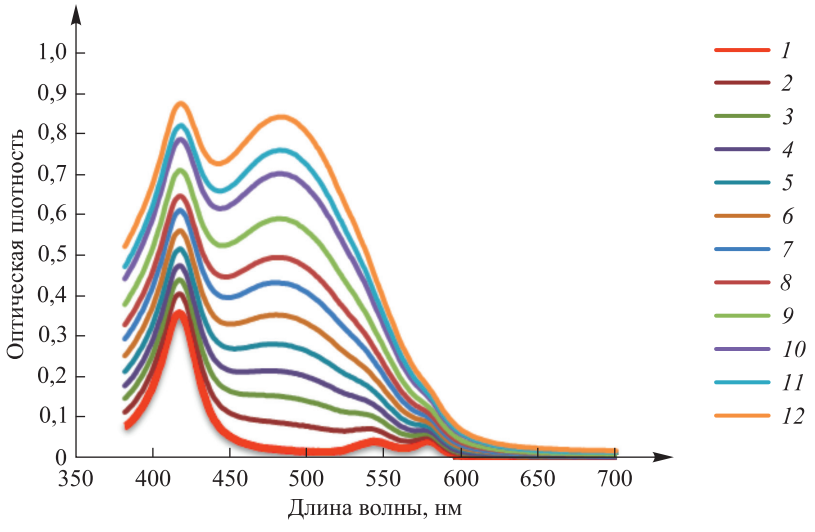

Рис. 5. Спектры поглощения раствора гемоглобина в присутствии эмодина:
1 – гемоглобин ($1{,}796 \cdot 10^{-4}$ моль/л); *2–12* – эмодин (($0{,}007\,93–0{,}087\,23$) $\cdot 10^{-4}$ моль/л)

Fig. 5. Light absorption spectra of a hemoglobin solution with the addition of emodin:
1 – hemoglobin ($1.796 \cdot 10^{-4}$ mol/L); *2–12* – emodin (($0.007\,93–0.087\,23$) $\cdot 10^{-4}$ mol/L)

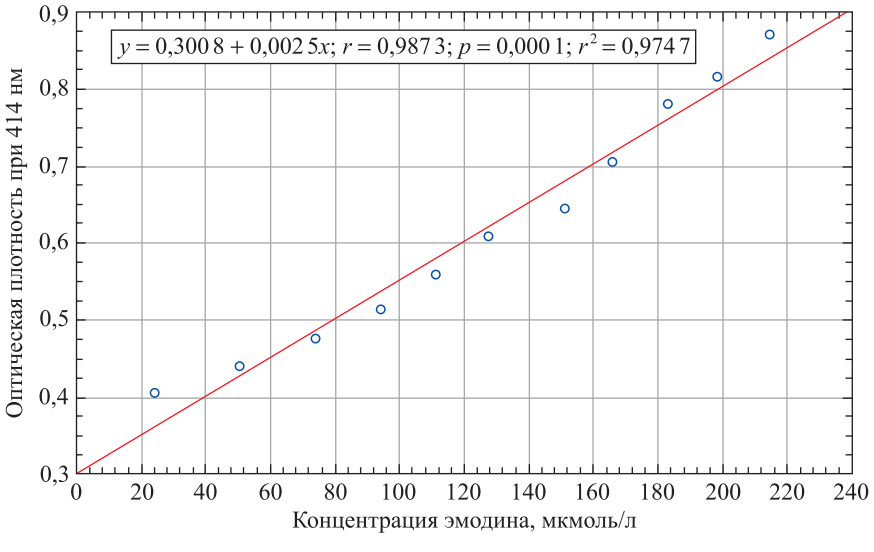

Рис. 6. Зависимость оптической плотности
раствора гемоглобина при 414 нм от концентрации эмодина

Fig. 6. Dependence of the optical density
of a hemoglobin solution at 414 nm on the concentration of emodin

В данном случае регрессионный анализ указывает на статистическую значимость и линейный характер зависимости оптической плотности раствора гемоглобина при длине волны 414 нм от концентрации эмодина с коэффициентом регрессии 0,002 510 ($p = 0{,}000\,000\,017$), свободный член равен 0,300 831 ($p = 0{,}000\,000\,066$). Так как происходит увеличение оптической плотности раствора гемоглобина, несмотря на снижение его концентрации, коэффициент регрессии имеет положительное значение. Это свидетельствует о взаимодействии эмодина с гемом, в противном случае коэффициент имел бы отрицательное значение. Из уравнения также видно, что оптическая плотность в полосе Соре увеличивается пропорционально количеству добавленного эмодина, что позволяет в дальнейшем при проведении фотометрического титрования определить точку эквивалентности, а также использовать гем как внутренний индикатор для количественного анализа эмодина.

Заключение

В результате проведенного исследования показано, что эмодин обладает ингибирующим действием на *Allium cepa*, при котором в тканях корней повышается каталазная активность. Это может быть связано с активацией антиоксидантной системы клеток, поскольку известно, что эмодин способен ингибировать цепь переноса электронов и способствовать образованию активных форм кислорода. На гемоглобине как модельном гемсодержащем белке было показано взаимодействие гема с эмодином, что может являться возможным механизмом нарушения функции гемсодержащих белков. Дальнейшая детализация биологического действия эмодина позволит расширить сферы его применения в защите растений, растениеводстве, а также определить роль данного соединения в экологии и физиологии растений.

Библиографические ссылки

1. Шмярко ЯП, Мазан ІП. *Лекавыя расліны ў комплексным лячэнні.* Мінск: Навука і тэхніка; 1989. 399 с.
2. Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology.* 1992;18(10):1833–1840. DOI: 10.1007/BF02751107.
3. Hasan A, Ahmed I, Jay M, Voirin B. Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*. *Phytochemistry.* 1995; 39(5):1211–1213. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00071-E.
4. Sridhar J, Jiawang Liu, Foroozesh M, Klein Stevens CL. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(2):357–365.
5. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x.
6. Ермаков АИ, редактор. *Методы биохимического исследования растений.* 2-е издание. Ленинград: Колос; 1972. 456 с.
7. Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology.* 2001;127(1):159–172. DOI: 10.1104/pp.127.1.159.
8. Аджиб ЮХ, Минченя АА, Климович ПГ, Маес В, Крук НН. Термохромизм растворов корролов в этаноле. *Журнал прикладной спектроскопии.* 2019;86(5):697–704.

References

1. Shmjarko JaP, Mazan IP. *Lekavyja rasliny w kompleksnym ljachjenni* [Medicinal plants in complex treatment]. Minsk: Navuka i tjehnika; 1989. 399 p. Belarusian.
2. Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology.* 1992;18(10):1833–1840. DOI: 10.1007/BF02751107.
3. Hasan A, Ahmed I, Jay M, Voirin B. Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*. *Phytochemistry.* 1995; 39(5):1211–1213. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00071-E.
4. Sridhar J, Jiawang Liu, Foroozesh M, Klein Stevens CL. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(2):357–365.
5. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x.
6. Ermakov AI, editor. *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii* [Biochemical research methods of plants]. 2nd edition. Leningrad: Kolos; 1972. 456 p. Russian.
7. Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology.* 2001;127(1):159–172. DOI: 10.1104/pp.127.1.159.
8. Ajeeb YH, Minchenya AA, Klimovich PG, Maes W, Kruk MM. Thermochromism of corrole solutions in ethanol. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2019;86(5):697–704. Russian.

Получена 08.11.2020 / исправлена 23.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 08.11.2020 / revised 23.02.2021 / accepted 03.05.2021.