

РОЛЬ ПРОСТАНОИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РАСТЕНИЯХ

Г.Г. Филиппова, Е.М. Лапковская, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Термин «простаноид» включает целый ряд простагландин-подобных соединений, образующихся из ненасыщенных жирных кислот и обладающих высокой биологической активностью. Для всех простаноидов характерно наличие цикlopентанового кольца и двух боковых углеводородных цепей с рядом заместителей. В зависимости от особенностей химической структуры и путей биосинтеза простаноиды делят на несколько классов: простагландины, простациклины, тромбоксаны, лейкотриены, изопростаны, фитопростаны и диноризопростаны [1]. Эти гормоноподобные вещества синтезируются во всех группах живых организмов: животных, высших и низших растениях.

Первые данные о биосинтезе простагландинов в растениях были получены в 1978 г. Билдом и соавторами [2]. Они показали, что бобовые растения содержат ферменты, катализирующие образование простагландина F_2 из арахидоновой кислоты. Позже были получены аналогичные результаты и для других видов растений. Установлено, что при внесении меченой арахидоновой кислоты в инкубационную среду, она включается в синтез простагландинов F_1 , F_2 и тромбоксанов B_2 , E_2 и D_2 растениями лука, чеснока, алое. Арахидоновая кислота является предшественником и ряда других биологически активных простаноидов. Полученные данные позволили авторам заключить, что растения, также как и животные организмы, содержат фермент циклооксигеназу, осуществляющую превращение арахидоновой кислоты и синтез простагландинов. Согласно более поздним исследованиям, для растений характерно наличие ферментов липоксигеназ, под действием которых происходит превращение арахидоновой кислоты в гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты, дающие начало различным простаноидам [1].

Высшие растения, как правило, не могут синтезировать арахидоновую кислоту и, таким образом, не образуют ни простагландинов, ни C^{20} -изопростанов. Вместо этого растения используют альфа-линоленовую кислоту для синтеза простагландин-подобных соединений жасмонатного типа через липоксигеназно/алленоксид-синтетазный путь, а также C^{18} -простаноиды, называемые фитопростаноидами (ФП), через неферментативный катализируемый свободными радикалами путь, аналогичный изопростановому пути в организме животных [1]. Оба пути неотъемлемо реализуются во многих, если не во всех растениях.

Пути образования фитопростаноидов в растениях впервые были описаны в 1998 г. [3]. Показано, что неэнзиматическое окисление α -линоленовой кислоты приводит к образованию целого спектра простаноидов в растительных тканях. ФП E_1 и F_1 образуются в результате аутоокисления линолеата атмосферным кислородом, тогда как ФП A_1 и B_1 синтезируются из E_1 . ФП D_1 дает начало J_1 и дезокси- J_1 -фитопростанам.

В последние три десятилетия на содержание простаноидов протестировано более 20 таксономически разных видов растений и во всех обнаружены свободные A_1 , B_1 , D_1 , E_1 , F_1 и дезокси- J_1 -фитопростаны. Простаноиды D_1 и дезокси- J_1 являются самыми распространенными среди фитопростанов в большинстве, если не во всех видах растений [4]. Их уровень в растительных тканях, как правило, самый высокий и достигает 1–2 мкг/г сухого веса растения. Наибольшее количество ФП F_1 (32 мкг/г) обнаружено в свежей пыльце *Betula alba*. Содержание других ФП значительно ниже, тем не менее, их уровень на 2–3 порядка выше, чем в животных клетках и составляет от 1 до 100 нг/г сухого веса [1, 2, 4]. Показано, что в период прорастания в почках древесных растений (тополь, береза, лиственница)

содержание простаноидов увеличивается, что может свидетельствовать об их участии в ростовых процессах растений. Кроме того, установлено, что уровень эндогенных простаноидов увеличивается в различных условиях, связанных с повышением генерации свободных радикалов (биотический и абиотический стрессы). Многочисленные данные свидетельствуют, что формирование эндогенных простаноидов может быть триггером при грибной инфекции (*Botrytis*), при действии пероксидов, тяжелых металлов, ранении и т.д. [5, 6, 7]. Вероятнее всего, под действием стресса происходит образование АФК, которые вызывают процессы неэнзиматического окисления линоленовой и других ненасыщенных жирных кислот и образование фитопростанов [4, 7].

Факты широкого распространения простаноидов в растениях, а также увеличение их содержания в ответ на оксидативный стресс, стимулировали исследования, связанные с выяснением роли простаноидов в различных физиологических процессах растительных организмов. Вместе с тем вопрос об их физиологическом действии ещё далёк от разрешения, хотя в последнее время в этом направлении уже достигнуты определённые успехи.

Первое исследование по влиянию простаноидов на растения представлено в 1974 г. Греневолом и Виссером, которые показали, что простагландины E_1 и E_2 влияют на цветение растений короткого дня (*Pharbitis nil*) [2]. Позже было установлено, что ряд простагландинов действует на гиббереллин-зависимые процессы. В частности простагландины E_1 , E_2 и A_2 стимулируют прорастание семян, E_1 и E_2 индуцируют активность кислой фосфатазы в прорастающих семенах ячменя, E_1 и F_1 оказывают влияние на удлинение coleoptилей и рост корешков, тогда как простагландины (ПГ) E_2 , A_1 , A_2 , F_2 не влияют на ростовые параметры проростков.

Установлено, что простаноиды влияют на процесс фотосинтеза, однако степень и направленность этого влияния зависит от типа простаноида [2]. Установлено, что простагландины E_2 и F_2 вызывают ингибирование переноса электронов от пластохинона к реакционному центру P_{700} , тогда как простагландины A_2 и B_2 стимулируют эту реакцию.

Некоторые авторы отмечают, что простаноиды вызывают образование фитоалексинов, что указывает на их возможную функцию в качестве медиаторов защитных реакций в ответ на стрессовые воздействия [1, 7, 8]. Генетический анализ клеточных культур Арабидопсис, обработанных ФП B_1 показал, что эти соединения запускают ряд процессов детоксикации [5]. Авторы установили, что под действием ФП происходит экспрессия нескольких генов – глутатион-S-трансферазы, гликозилтрансферазы и АТФ-связывающих транспортеров – и могут усиливать способность растений инактивировать продукты окисления липидов. Известно, что глутатион-трансфераза является триггером при оксидативном стрессе.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что простаноиды являются регуляторами не только ростовых процессов растений, но и участвуют в индукции механизмов устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов. Согласно современным представлениям, простаноиды являются важным классом сигнальных молекул, как в животных, так и растительных организмах, и участвуют в формировании стресс-ответа [4, 6, 7, 9].

Все нативные простаноиды обладают двумя наиболее существенными недостатками: широким (часто противоположным) спектром биологических эффектов и краткосрочностью действия в связи с их невысокой стабильностью. Стабильность и специфичность этих соединений можно повысить путем химической модификации отдельных участков молекулы [10, 11]. Структурная особенность молекул простаноидов такова, что любые модификации ее структуры изменяют гамму биологического действия. Это ведет к получению производных простаноидов с измененным спектром действия. Причем, в ряде случаев синтезируемые аналоги могут обладать более сильным физиологическим действием, чем природные.

Скрининг синтетических производных простаноидов с измененной структурой открывает практически неограниченные возможности выбора аналогов простаноидов с селективным действием на те или иные системы, органы, процессы.

Отмеченное в литературе влияние простаноидов на ростовые процессы растений стимулировало проведение исследований, направленных на выяснение действия предпосевной обработки семян синтетическими аналогами простаноидов на основе 2-ацилциклогексан-1,3-дионон на начальные этапы роста и развития злаковых культур.

Простаноиды были синтезированы и представлены Институтом биоорганической химии НАН Беларуси.

Методы исследования

В качестве объекта исследования использовали семена озимого тритикале сорта «Микола». Семена замачивали в течение 24 часов в дистиллированной воде (контроль) и в растворах простаноидов в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-9} моль/л. Была исследована биологическая активность пяти синтетических аналогов простаноидов: N-гептил-2-{3-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]фенокси}ацетамид (ЛЕ1Г), 5-(гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-она (ЛЕ5Г), N-гептил-2-{5-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метокси-фенокси}ацетамида (ЛЕ3Г), метил-6-14-оксо-3(3-фенилпропил)-4,5дигидрофуран-2-иламиногексаноат (ЛЕ8К) и (Е)-метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидрофуран-2-иламино)гексаноата (ЛЕ11К).

Через 24 часа определяли количество набухших и наклюнувшихся семян и высаживали их в бумажные рулоны. Проростки тритикале выращивали в течение 7 суток на дистиллированной воде в климатической камере Climacell (Германия) при интенсивности освещения 5000 люкс в режиме 16 ч – свет, 8 ч – темнота, влажности 60% и температуре 22–24°C. На 2 сутки определяли всхожесть семян в каждом варианте опыта и активность амилазы. На 3 сутки измеряли длину coleoptилей во всех вариантах опыта, на 7 сутки определяли длину, ширину и толщину листьев, размер клеток мезофилла и количество фотосинтетических пигментов и белков в листьях, а также проводили электрофоретический анализ белков листьев тритикале.

Экстракцию пигментов из растительного материала проводили с помощью ацетона. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Varian Cary 50 Bio (Германия) при длинах волн 662, 644 и 440 нм. Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в вытяжке рассчитывали в соответствии с формулами, приведенными в работе [12]. Активность амилазы определяли по скорости гидролиза крахмала, количество водорастворимых белков определяли по методу Лоури [12]. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидных гелях осуществляли, используя камеру для вертикального электрофореза «Хеликон» VE-10 (Россия). Анализ результатов электрофореза производили с помощью программного пакета Total Lab.

В каждой серии экспериментов выращивали по 100 семян, повторность опытов 3–5-кратная. На диаграммах приведены средние значения показателей во всех вариантах опыта и ошибка средней величины.

Результаты и обсуждение

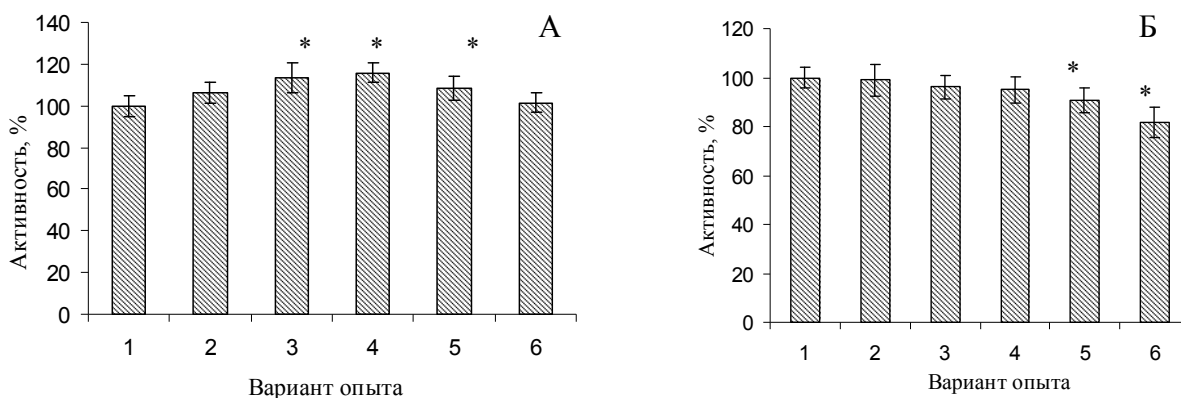
На начальном этапе было исследовано влияние простаноидов на всхожесть и скорость прорастания семян. Установлено, что исследованные синтетические аналоги простаноидов проявляют биологическую активность в достаточно низких концентрациях – 10^{-6} – 10^{-7} моль/л, что сравнимо с уровнем эндогенных простаноидов в растениях. Более высокие концентрации всех исследованных соединений приводят к ингибированию начальных стадий развития растений. Показано, что предпосевная обработка семян простаноидами ЛЕ1Г, ЛЕ5Г и ЛЕ8К в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} моль/л вызывает увеличение всхожести и скорости прорастания семян. Обработка семян простаноидом ЛЕ11К не оказывает достоверного влияния на исследуемые параметры, тогда как ЛЕ3Г приводит к снижению, как всхожести, так и скорости прорастания семян тритикале.

Известно, что при прорастании семян в семядолях происходит активация и новообразование ферментных систем, необходимых для обеспечения использования

запасных веществ. Большая роль в этом процессе принадлежит амилазе, осуществляющей гидролиз запасных углеводов и обеспечивающей энергией развивающийся проросток.

Для установления механизма действия простаноидов на скорость прорастания семян нами было исследовано их влияние на активность амилазы в прорастающих семенах тритикале. В результате проведенных экспериментов обнаружена прямая зависимость между скоростью прорастания семян и активностью амилазы. На примере ЛЕ5Г установлено, что простаноиды, увеличивающие скорость прорастания семян в концентрации 10^{-7} и 10^{-6} моль/л, приводят к увеличению активности амилазы на 15–20% по сравнению с контролем (рисунок 1), а предпосевная обработка семян простаноидом ЛЕ3Г снижает ее активность от 10 до 20% с ростом концентрации. Обработка семян простаноидом ЛЕ11К во всех исследуемых концентрациях не влияет на активность амилазы в прорастающих семенах.

Таким образом, очевидно, что снижение всхожести семян при их обработке высокими концентрациями простаноидов связано с подавлением амилазной активности, тогда как увеличение всхожести семян под действием простаноидов обусловлено повышением активности данной группы ферментов. Известно, что активация амилазы в прорастающих семенах происходит под действием гиббереллинов. В литературе имеются данные, что ПГЕ₁ и Е₂ оказывают действие аналогичное гибберелинам [1]. Полученные данные позволяют предположить, что некоторые синтетические аналоги простаноидов, в частности ЛЕ5Г, в низких концентрациях обладают гиббереллин-подобной активностью.



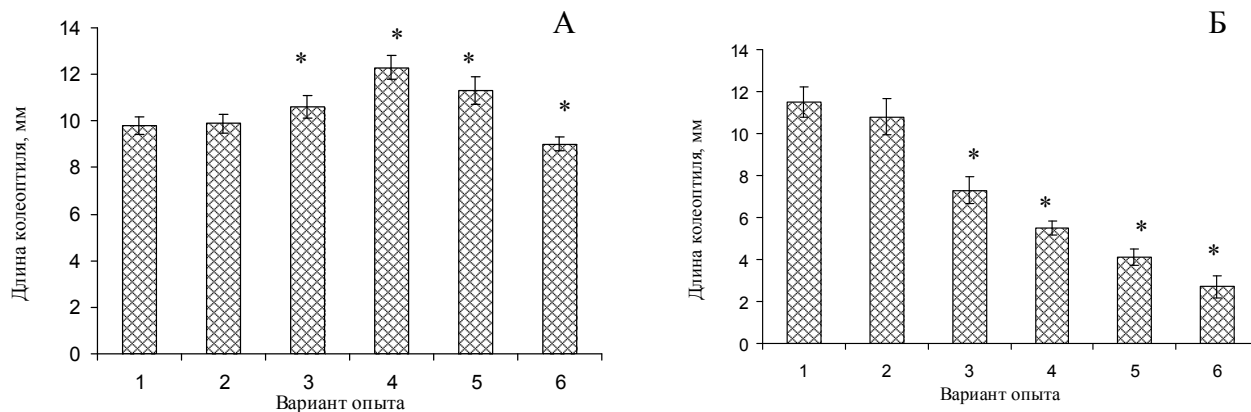
1 – контроль, 2 – 6 концентрации простаноида: 10^{-9} моль/л, 10^{-8} моль/л, 10^{-7} моль/л, 10^{-6} моль/л, 10^{-5} моль/л, соответственно

Рисунок 1 – Влияние предпосевной обработки семян синтетическими аналогами простаноидов ЛЕ5Г (А) и ЛЕ3Г (Б) на активность амилазы в прорастающих семенах тритикале

* – различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$

Анализ концентрационных зависимостей действия предпосевной обработки семян тритикале синтетическими аналогами простаноидов позволили установить, что высокие концентрации всех исследованных простаноидов (10^{-4} и 10^{-5} моль/л) вызывают ингибирование морфометрических показателей проростков. Тогда как в более низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-7} моль/л) различные синтетические аналоги простаноидов оказывают разнонаправленное действие на ростовые характеристики растений. На рисунке 2 представлены концентрационные зависимости действия предпосевной обработки семян двумя простаноидами – ЛЕ8К, вызывающим стимулирующее действие на ростовые характеристики проростков, и ЛЕ3Г, оказывающим сильный ингибирующий эффект.

Скрининг биологической активности пяти исследованных соединений позволил установить, что предпосевная обработка семян протаноидами ЛЕ1Г, ЛЕ5Г и ЛЕ8К в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} моль/л приводит к увеличению длины coleoptily и первого листа от 12 до 20% по сравнению с контролем. Наиболее сильное стимулирующее действие оказывает протаноид ЛЕ5Г в концентрации 10^{-7} моль/л.



1 – контроль, 2 – 10^{-9} моль/л протаноида, 3 – 10^{-8} моль/л протаноида, 4 – 10^{-7} моль/л протаноида, 5 – 10^{-6} моль/л протаноида, 6 – 10^{-5} моль/л протаноида

Рисунок 2 – Действие предпосевной обработки семян тритикале синтетическими аналогами протаноидов ЛЕ8К (А) и ЛЕ3Г (Б) на длину coleoptily

* – различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$

Аналогичные закономерности выявлены при действии предпосевной обработки семян исследованными протаноидами на структурно-функциональную организацию фотосинтетического аппарата проростков. Высокие концентрации всех исследованных протаноидов (10^{-4} и 10^{-5} моль/л) вызывают снижение фотосинтетической поверхности листа и содержание фотосинтетических пигментов. В более низких концентрациях (10^{-7} моль/л) протаноиды ЛЕ1Г, ЛЕ5Г и ЛЕ8К приводят к увеличению площади листа, объема клеток мезофилла и содержания фотосинтетических пигментов.

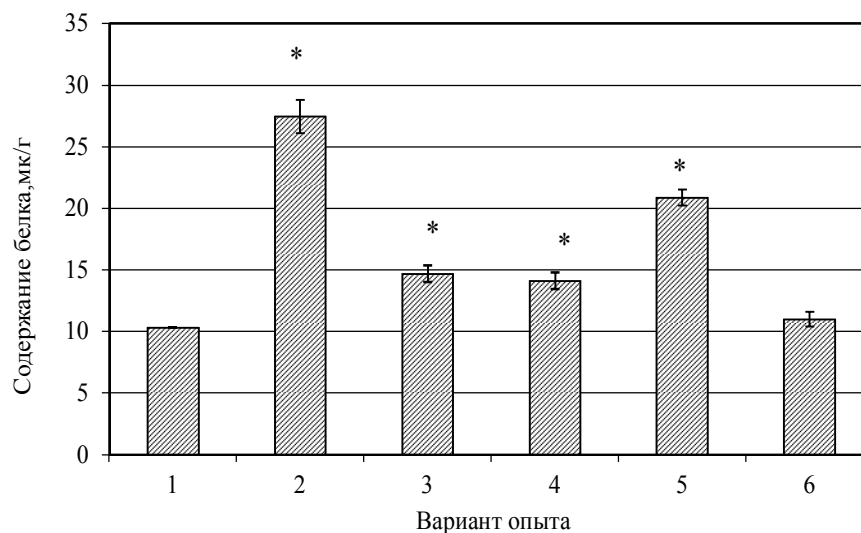
Электрофоретический анализ белков листьев проростков показал, что при обработке семян протаноидом ЛЕ5Г происходит увеличение содержания двух белков с молекулярной массой 53 и 13 kDa, соответствующих большой и малой субъединицам рибулозобисфосфаткарбоксилазы – ключевого фермента темновой стадии фотосинтеза, что может свидетельствовать об активации скорости фиксации углекислоты.

Обработка семян протаноидом ЛЕ11К не оказывает видимого воздействия на фотосинтетический аппарат растений, а ЛЕ3Г во всех исследованных концентрациях вызывает ингибирование процессов фотосинтеза.

Интенсификация вегетативного роста – важнейший показатель для повышения биологической продуктивности растений. Однако важным фактором является качество полученной продукции, в первую очередь содержание белка. Поэтому на следующем этапе мы исследовали влияния предпосевной обработки семян синтетическими аналогами протаноидов ЛЕ1Г, ЛЕ3Г, ЛЕ5Г, ЛЕ8К и ЛЕ11К на содержание белка в листьях 7-дневных проростков тритикале. Литературные данные, а также представленные выше экспериментальные результаты свидетельствуют, что протаноиды проявляют свою активность в низких концентрациях, поэтому для обработки семян нами была использована концентрация протаноидов 10^{-7} моль/л.

Обработка семян протаноидами ЛЕ1Г и ЛЕ8К в концентрации 10^{-7} моль/л оказывает наиболее существенное действие на уровень белка в листьях тритикале (рисунок 3). Под

влиянием данных соединений происходит увеличение содержания белка в 1,5–2 раза по сравнению с контролем. Простаноид ЛЕ5Г также приводит к увеличению уровня белка в листьях тритикале, однако в гораздо меньшей степени – примерно на 40–50% по сравнению с контролем. Как известно, основной водорастворимый белок листьев растений представлен ферментами фотосинтетического усвоения углекислоты. Учитывая тот факт, что простаноиды ЛЕ1Г, ЛЕ5Г и ЛЕ8К оказывали ростостимулирующий эффект, очевидно, что действие этих соединений на проростки связано с активацией фотосинтетической активности растений.



1 – контроль, 2 – ЛЕ1Г, 3 – ЛЕ3Г, 4 – ЛЕ5Г, 5 – ЛЕ8К, 6 – ЛЕ11К

Рисунок 3 – Влияние предпосевной обработки семян простаноидами в концентрации 10^{-7} моль/л на содержание белков в листьях тритикале
* – различия достоверны при $P \leq 0,05$

Простаноид ЛЕ11К в концентрации 10^{-7} моль/л не оказывает достоверного влияния на содержание белков в листьях проростков тритикале. Предпосевная обработка семян простаноидом ЛЕ3Г приводит к незначительному увеличению содержания белка в листьях тритикале. Учитывая тот факт, что данный простаноид обладает ярко выраженным ингибирующим действием на ростовые характеристики проростков, можно предположить, что рост уровня белка в листьях связан с накоплением стрессовых белков. Данное предположение согласуется с результатами, представленными в работе [13], в которой показано, что окисгенированные жирные кислоты инициируют образование стрессовых белков.

Выводы

На основании представленных данных можно сделать вывод, что предпосевная обработка семян синтетическими простаноидами оказывает разнонаправленное действие на физиолого-биохимические показатели проростков тритикале. Простаноиды ЛЕ1Г, ЛЕ5Г и ЛЕ8К в концентрациях 10^{-6} – 10^{-7} моль/л обладают ростостимулирующим действием. Обработка семян простаноидом ЛЕ11К не оказывает видимого воздействия, как на морфометрические, так и физиологические характеристики проростков, а ЛЕ3Г вызывает ингибирование ростовых процессов. Различная направленность действия простаноидов, вероятно, связана с особенностями структуры их молекул. Введение дополнительной метокси-группы в молекулу простаноида приводит к изменению его биологического действия со стимулирующего (ЛЕ1Г) на ингибирующее (ЛЕ3Г). Введение дополнительной двойной связи в углеводородной цепи молекулы ЛЕ8К, в результате чего образуется ЛЕ11К, приводит к снижению ростостимулирующего действия простаноида.

Список литературы

1. The isoprostanooids pathway in plants / I. Thoma [et al.] // *Chem. Phys. Lipids*. – 2004. – Vol. 128. – P. 135–148.
2. Groenewald, E.G. Prostaglandins and related substances in plants / E.G. Groenewald // *Botanical Review*. – 1997. – P. 199–221.
3. Parchmann, S. Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from alpha-linolenic acid in plant / S. Parchmann, M.J. Mueller // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 32650–32655.
4. New bioactive oxylipins formed by nonenzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes / T. Durand [et al.] // *Lipids*. – 2009. – Vol. 10. – P. 875–888.
5. B₁-Phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses / C. Loeffler [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 1. – P. 328–340.
6. Eckardt, N.A. Oxylipin signaling in plant stress responses / N.A. Eckardt // *Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – P. 495–497.
7. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis / S. Mueller [et al.] // *Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – P. 768–785.
8. Imbusch, R. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F₁ (phytoprostanes F₁) in plants / R. Imbusch, M.J. Mueller // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 124. – P. 1293–1303.
9. Тарчевский, И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
10. Аджихина, И.С. Простагландины / И.С. Аджихина. – М.: Медицина, 1978. – 416 с.
11. Лахвич, Ф.А. Биорегуляторы: лечебные и диагностические препараты. Химические средства защиты растений / Ф.А. Лахвич // *Наука – народному хозяйству* / Ф.А. Лахвич. – Минск, 2002. – С. 611–641.
12. Практикум по физиологии растений / Третьяков Н.Н. и др.; под ред. Н.Н. Третьякова. – М: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
13. Васюкова, Н.И. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений / Н.И. Васюкова, О.Л. Озерецковская // *Физиология растений*. – 2009. – Т. 56, № 5. – С. 643–653.

**THE ROLE OF PROSTANOIDS IN THE REGULATION OF PLANT
PHYSIOLOGICAL PROCESSES****Н.Н. Filiptsova, E.M. Lapkovskaya, V.M. Yurin***Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Effect of seed treatment by synthetic analogues of prostanoids is investigated on morpho-physiological characteristics of triticale. It was shown that prostanoids LE1G, LE5G and LE8K in concentrations of 10^{-6} – 10^{-7} mol/l are increased growth of seedling, as well as have a stimulation effect on the structural-functional organization of the photosynthetic apparatus. Prostanoid LE11K does not have a significant influence on research options, and LE3G is the inhibition of growth processes.