

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

Копіч Віктор Миколайович

УДК 577.152.1: 577.325.6

**ФУНКЦІОНУВАННЯ ЛПОКСИГЕНАЗ ПІД ВПЛИВОМ
РОСЛИННИХ ГОРМОНІВ ТА ЛПОКСИГЕНАЗНИХ
МЕТАБОЛІТІВ**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, відділ молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини.

Науковий керівник кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Харченко Ольга Володимирівна,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
старший науковий співробітник відділу молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Таран Наталія Юріївна
завідувач кафедри фізіології та екології рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка

кандидат біологічних наук
Бабенко Лідія Михайлівна
старший науковий співробітник відділу фітогормонології
Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України

Захист відбудеться 13 травня 2016 р. о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (02094, Київ-94, вул. Мурманська 1).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, 02094, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

Автореферат розісланий 11 квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В.О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ліпоксигенази (КФ 1.13.11.-) – ферменти ліпідного обміну, що каталізують регіо- та стереоспецифічне введення молекулярного кисню до 1,4-цис,цис-пентадієнового фрагменту поліненасичених жирних кислот з утворенням відповідних гідропероксидів [Grechkin A. N. et al., 1999], [Joo Y.-S. et al., 2012]. Ця реакція є ключовою у ліпоксигеназному каскаді синтезу біологічно активних сполук – оксиліпінів, які забезпечують відповідь рослини на дію патогенів, засолення, низької температури, механічного ушкодження та залучені в процесах росту, розвитку та старіння [Feussner I. et al., 2002], [Porta H. et al., 2002], [Vellosillo T. et al., 2007], [Marcos R. et al., 2015], [Babenko L. et al., 2015]. Несприятливі фактори середовища змінюють напрям метаболічних процесів та активують захисні механізми рослинної клітини. Зокрема, під дією підвищених концентрацій солі в рослині накопичується абсцизова кислота, під дією холоду значно зростає рівень брассиностероїдів. Є окремі дані про вплив цих гормонів на рослинні ліпоксигенази [Fedina E. O. et al., 2004], [Ibrahim M. H. et al., 2013], але практично немає відомостей про співвідношення функціональної активності певних гілок 9- та 13-ліпоксигеназного шляху синтезу оксиліпінів у відповіді рослини на дію цих сполук та природних стресорів. Біологічна важливість продуктів ліпоксигеназного каталізу в рослинах обумовлює дослідницький інтерес до пошуку шляхів регуляції активності 9- та 13-ліпоксигеназ рослин; можливості коригування рівня ліпоксигеназних метаболітів та використання продуктів ліпоксигеназного шляху окиснення поліненасичених жирних кислот у сільському господарстві та промисловості. Встановлення механізмів дії ліпоксигеназ і пошук нових ефективних інгібіторів і активаторів ферментів серед природних сполук та їх синтетичних похідних приведе до створення нових технологічних засобів регуляції процесів функціональної адаптації рослин до несприятливих умов оточуючого середовища.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною науково-дослідних робіт Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (тема: "Вивчення механізмів дії та регуляції ферментів каскаду поліненасичених жирних кислот у системах, що моделюють біологічні мембрани" (№ держреєстрації 0103U005437); тема: "Молекулярна асоціація, функціональні властивості та шляхи регуляції активності ферментів каскадів поліненасичених жирних кислот" (№ держреєстрації 0106U004305); тема: "Ключові ферменти ліпоксигеназного шляху перетворення поліненасичених жирних кислот та дія біологічно активних сполук" (№ держреєстрації 0109U002339); тема: ЦНП 9.1-07 „Розвиток пріоритетних напрямів синтезу потенційних низькомолекулярних біорегуляторів і дослідження їх властивостей в модельних системах” (№ держреєстрації 0107U002550); тема: ЦНП 9.1-12 „Розвиток методів синтезу, дослідження властивостей та механізмів дії нових потенційно біоактивних сполук” (№ держреєстрації 0112U002657)), а також

за підтримки міжнародного гранту ДФФД 14.4/018 "Брассиностероїди в регуляції метаболізму клітин рослин за дії низькотемпературного стресу" (№ Ф14/247-2007).

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є встановлення закономірностей прояву функціональної активності 9- та 13-ліпоксигеназ з використанням природних сполук і факторів – рослинних гормонів, первинних ліпоксигеназних продуктів, абіотичних стресорів.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

- визначити вплив рослинного гормону 24-епібрассиноліду на активність ліпоксигеназ в проростках кукурудзи за дії низьких температур;
- порівняти активність ліпоксигеназ в проростках кукурудзи за дії сольового стресору та рослинного гормону абсцизової кислоти;
- з'ясувати дію первинних 13-ліпоксигеназних продуктів на активність 9-ліпоксигенази та швидкість біоконверсії гідропероксидів полієнових жирних кислот в бульбах картоплі за дії механічного ушкодження;
- вивчити каталітичні властивості гідропероксидліази з проростків картоплі;
- порівняти дію природних брассиностероїдів та їх синтетичних похідних на 9-ліпоксигеназу з бульб картоплі в міцелярних системах *in vitro*.

Об'єкт дослідження – ферментативне окиснення поліненасичених жирних кислот за каталітичної дії ліпоксигеназ.

Предмет дослідження – закономірності зв'язку ліпоксигеназної активності з дією природних стресорів, рослинних гормонів і ліпоксигеназних метаболітів.

Методи дослідження – обернено-фазова вискоефективна рідинна хроматографія використана для аналізу продуктів ферментативної реакції, хроматографічні методи очищення білків та ліпідів, УФ-спектрофотометрія використана для дослідження кінетики ферментативного окиснення; методи ферментативного синтезу, кінетичні та математичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено синергізм дії низької температури та 24-епібрассиноліду на активність 13-ліпоксигенази. Виявлено компенсаторний характер змін активності 9- та 13-ліпоксигеназ в проростках кукурудзи як за дії сольового стресору, так і абсцизової кислоти. Показано інгібуючу дію первинних продуктів 13-ліпоксигенази на активність ключового ферменту 9-ліпоксигеназного шляху синтезу оксиліпінів та швидкість біоконверсії 13-гідропероксиду лінолевої кислоти за дії механічного ушкодження бульб картоплі. Встановлено, що лізофосфатидилінозит та лізофосфатидна кислота є потужними активаторами 9-ліпоксигенази. Знайдено нові інгібітори гідропероксидліази – 9-гідропероксид лінолевого спирту та фосфатидну кислоту. Показано, що введення в структуру 24-епібрассиноліду додаткової активної складової у

вигляді залишку гетероауксину на порядок зменшує IC_{50} в реакції ліпоксигеназного каталізу.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи створюють наукове підґрунтя для розробки технологічних засобів регуляції функціональної активності ліпоксигеназ. Виявлено нові інгібітори ліпоксигеназ серед синтетичних похідних брассиностероїдів. Запропоновано експериментальні системи для визначення функціональної активності ліпоксигеназ *in vivo* придатні для скринінгу хімічних сполук – потенційних регуляторів активності ферменту. Результати дослідження особливостей функціонування 9- та 13-ліпоксигеназ поглиблюють сучасні уявлення щодо ролі фітогормонів, їх синтетичних аналогів, ліпоксигеназних метаболітів, абіотичних стресорів у регуляції ліпоксигеназної гілки метаболізму рослинної клітини та дають підстави застосовувати їх у навчальних курсах з біоорганічної хімії, біохімії, ензимології та біотехнології. Гідропероксидліаза може бути використана у ферментативному синтезі альдокислот з метою дослідження їх біологічної активності.

Особистий внесок здобувача. Експериментальна частина роботи та обробка отриманих результатів виконані здобувачем особисто. Планування та обговорення роботи, а також формулювання висновків відбувалося спільно з науковим керівником кандидатом біологічних наук Харченко О. В. Природні брассиностероїди та їх синтетичні похідні синтезовані у відділі Хімії стероїдів ІБОХ НАН Білорусі під керівництвом академіка Хрїпача В.О. Друковані праці були підготовлені за безпосередньої участі дисертанта.

Апробація результатів дисертаційної роботи. Результати роботи представлені на XXIV, XXVI та XXIX конференціях з біоорганічної хімії та нафтохімії ІБОНХ НАН України (Київ, 2009, 2011, 2014 рр.), Міжнародній конференції „Современная физиология растений: от молекул до экосистем” (Сиктивкар, Росія 2007), 2-му міжнародному симпозиумі «Регулятори росту рослин; внутрішньоклітинна гормональна сигналізація та застосування у сільському господарстві» (Київ, 2007), II Українсько-Польській науковій конференції “Membrane and sorption processes and technologies” (Kyiv, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 праць, з них: 5 статей у фахових виданнях та 8 тез наукових доповідей.

Структура та об'єм роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальної частини, викладу отриманих результатів та їх обговорення (розділи 2, 3), висновків і списку використаних джерел (213 найменувань). Дисертаційна робота викладена на 132 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 6 таблицями, 32 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено сучасні уявлення про будову та особливості функціонування ферментів ліпоксигеназних шляхів перетворення поліненасичених жирних кислот. Розглянуто роль продуктів

ліпоксигеназного ферментативного каскаду синтезу оксиліпінів у метаболізмі живих організмів.

Матеріали та методи досліджень. У роботі було використано етіюльовані проростки кукурудзи – *Zea mays L.* сорту Говерла та бульби картоплі *Solanum tuberosum L.* сорту Луговська.

Для вивчення впливу 24-епібрассиноліду (24-ЕБР) та низької температури на активність ліпоксигеназ (ЛО) зерна кукурудзи пророщували 5 діб у термостаті при 25 °С, у темряві, в присутності або у відсутності 0,01 та 1 мкМ 24-ЕБР. Частину 5-денних проростків витримували 24 години при 5 °С, а іншу частину рослин залишали на цей час при 25 °С (контрольні проростки).

Дослідження дії сольового стресору або абсцизової кислоти (АБК) на активність ЛО в етіюльованих 5-денних проростках кукурудзи проводили за наступної експозиції 0,2 М розчину хлориду натрію або 10 мкМ АБК. ЛО екстрагували з проростків кукурудзи за модифікованим методом [Роса Е. et al., 1990] у 0,1 М натрій-ацетатному буфері (рН 4,5), що містив 0,1 % Brij 99, та 0,1 мМ ЕДТА.

Дослідження дії механічного ушкодження проводили за експозиції дисків (19 мм x 0,3 мм) з бульб картоплі у розчині (0,05 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,0; 1мкМ 13-гідропероксид лінолевої кислоти (13-ГПЛК) або 1мкМ 15-гідропероксид арахідонової кислоти (15-ГПАК)).

Виділення та визначення активності ЛО з бульб картоплі проводили за методом [Харитоненко Г.І. та ін., 2008].

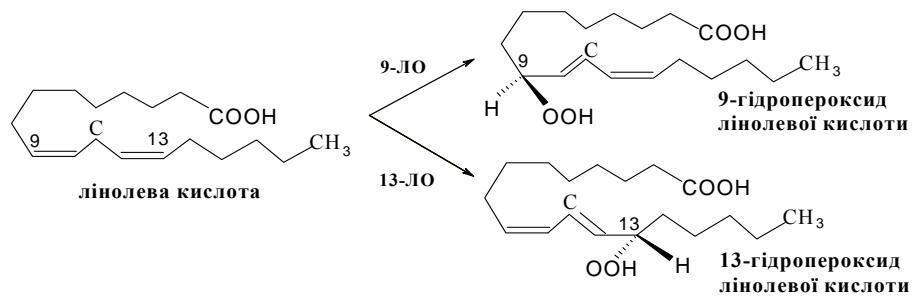
Схема очистки гідропероксидліази (ГПЛ) з проростків картоплі складалася з екстракції в присутності 0,01 % Brij-99, висолювання 25-50% сульфатом амонію, діалізу та хроматографії на DEAE-Toyopearl. Активність ГПЛ визначали, використовуючи як субстрати гідропероксиди лінолевої та арахідонової кислот, лінолевого спирту, які отримували методом ферментативного синтезу, за участі ліпоксигеназ з сої та бульб картоплі [Fauconnier M. L. et al., 2002], [Butovich I. A. et al., 1998]. Чистоту отриманих гідропероксидів визначали методом обернено фазової високоефективної рідинної хроматографії на LiChrosorb RP-18 (Merck) з рефрактометричним детектором (рухома фаза - метанол:вода = 9:1, 0,1% H₃PO₄, v/v).

Визначення активності ферментів (ЛО та ГПЛ) проводили на Specord M-40 («Carl Zeiss», Німеччина), реєструючи зміну з часом оптичного поглинання реакційної суміші при $\lambda=235$ нм (опт.од.₂₃₅), що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції 23000 М⁻¹см⁻¹). Для оцінки активності ферментів визначали стаціонарну швидкість реакції (V_{st}) в одиницях оптичного поглинання за хвилину (опт.од.₂₃₅/хв) або у мкМ окисненого субстрату за хвилину (мкМ/хв). Реакційні суміші для визначення активності 9- та 13-ЛО з проростків кукурудзи: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3), 0,02 % Lubrol PX; 0,1 мМ лінолева кислота або 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0), 0,02 мМ лінолева (арахідонова) кислота, відповідно.

Результати експериментів оцінювали за t-тестом Ст'юдента та *U*-критерієм Мана-Вітні (Mann-Whitney *U*-test). Статистично достовірною вважали різницю при $p \leq 0,05$.

Вплив 24-епібрасиноліду на ліпоксигенази в проростках кукурудзи за дії низьких температур. Досліджено вплив 24-епібрасиноліду (24-ЕБР) на активність 9- та 13-ліпоксигеназ (9-ЛО та 13-ЛО) в етіюльованих проростках кукурудзи при 25 °С та 5 °С. 9-ЛО з проростків кукурудзи каталізує реакцію утворення 9-гідропероксидів, а 13-ЛО – 13-гідропероксидів лінолевої кислоти (Схема 1).

Схема 1



Показано, що за різної експозиції 24-ЕБР при 25 °С активність 9-ЛО в проростках зростає більше ніж у 6 разів (рис. 1а), а активність 13-ЛО – більш ніж втричі (рис. 1б).

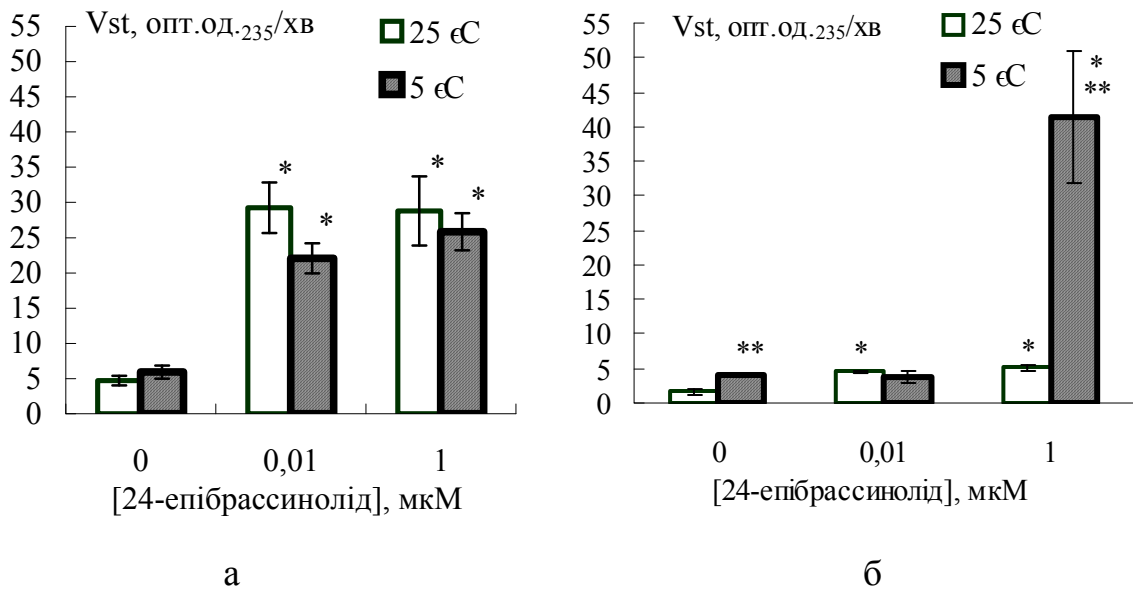


Рис. 1. Вплив 24-епібрасиноліду на активність 9-ліпоксигенази (а) та 13-ліпоксигенази (б) в проростках кукурудзи при 25°C та 5°C, $M \pm m$ ($n = 3-6$), * зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової температури 25 °С та 5 °С), ** зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової експозиції 24-епібрасиноліду)

При 5 °С та дії 24-ЕБР (10^{-8} та 10^{-6} М) активність 9-ЛО підвищується в 4 рази порівняно з контролем без 24-ЕБР (рис. 1а), у той час як активність 13-ЛО зростає майже в 10 разів під впливом 10^{-6} М 24-ЕБР (рис. 1б).

Порівняльний аналіз активності 13-ЛО на фоні 25 °С та 5 °С показав сумісний ефект низької температури та 24-ЕБР (10^{-6} М), який перевищив втричі ефект дії сполуки при 25 °С (рис. 1б). Навпаки, активація 9-ЛО за дії 24-ЕБР практично не залежить від температури середовища (рис. 1а)). Порівняння дії 24-ЕБР (10^{-6} М) на активність 13-ЛО при 25 °С та 5 °С виявило 8-кратне зростання в умовах низької температури, в той же час достовірні зміни в активності 9-ЛО не були виявлені (рис. 1а). Більш виражений стимулюючий ефект 24-ЕБР (10^{-6} М) на 13-ЛО на фоні низької температури (рис. 1б) свідчить про інтенсифікацію 13-ЛО шляху перетворення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) за таких умов. Оскільки 13-ЛО є ключовим ферментом синтезу жасмонової кислоти, вірогідним є підвищення рівня останньої під дією 24-ЕБР на рослинну клітину на фоні низької температури середовища. Ефект дослідженої сполуки на 9-ЛО є теж стимулюючим, але майже однаковим при різних температурах (рис. 1а). З літератури відомо, що 24-ЕБР збільшує кількість 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти та 12-гідроксидодеценної кислоти [Fedina E. O. et al., 2004], а брассиностероїди захищають рослину від високої та низької температур, посухи, підвищеної концентрації солі, механічних ушкоджень [Mussig C. et al., 2006], [Khrpach V. et al., 2000], [Schaller H., 2003]. Отримані результати свідчать про залучення ліпоксигеназних шляхів синтезу оксиліпінів у брассиностероїд-індуковану відповідь рослинної клітини, що має забезпечувати реалізацію антистресових програм при адаптації рослин до дії низьких температур. Встановлено, що 10^{-6} М 24-ЕБР за дії низької температури значно інтенсифікує 13-ЛО та не обумовлює температурної залежності росту активності 9-ЛО в проростках кукурудзи порівняно з контролем.

Порівняльне дослідження дії сольового стресора та абсцизової кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи. Досліджено вплив 0,2 М NaCl на активність 9- та 13-ЛО в проростках кукурудзи по відношенню до активності в контрольних рослинах. На рис. 2 представлено динаміку змін активності 9- та 13-ЛО за дії 0,2 М NaCl на 5-денні етіюльовані проростки кукурудзи. Зниження активності 9-ЛО спостерігається на 4 годину дії 0,2 М NaCl (залишкова активність – 64 %) з поступовим поверненням за проміжок часу 6-24 години до базального рівня. Активність 13-ЛО не змінюється в перші шість годин, а на 8 і 24 годину різко знижується відповідно на 37 та 58 % по відношенню до рівня активності в контрольних рослинах. Отже, відгук з боку ЛО, що синтезують оксиліпіни з певними фізіологічними властивостями, за дії підвищеної концентрації солі є розділеним у часі. Так, обробка 0,2 М NaCl проростків кукурудзи на ранніх етапах (4 години) знижує функціональну активність 9-ЛО, практично не змінюючи активності 13-ЛО, і, навпаки, нормалізація активності 9-ЛО на 6-24 годину супроводжується різким зниженням активності 13-ЛО на 8-24 годину.

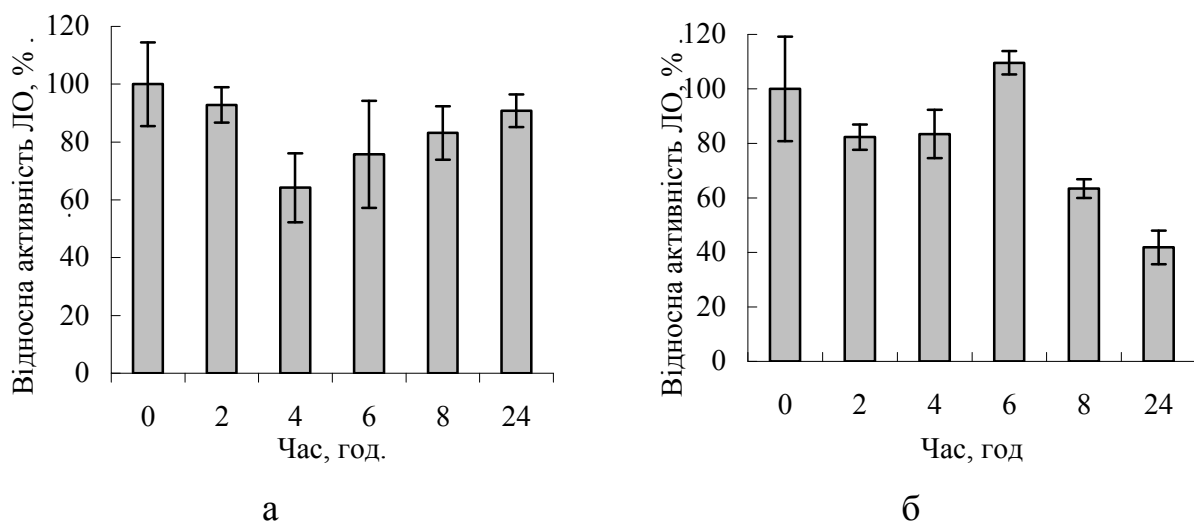


Рис. 2. Динаміка змін активності 9-ЛО (а) та 13-ЛО (б) в проростках кукурудзи за дії 0,2 М NaCl

Сприйняття та передача сигналу абсцизової кислоти (АБК) у рослинній клітині – процес, в основі якого лежать тонкі молекулярні механізми, в яких задіяні ферменти ЛО сигнальної системи [Ibrahim M. H. et al., 2013]. З літератури відомо про антагонізм дії АБК та жасмонатів (продуктів 13-ЛО шляху синтезу оксиліпінів) як регуляторів експресії генів за умов сольового стресу [Moons A. et al., 1997]. Різде зниження з часом активності ключового ферменту синтезу жасмонової кислоти – 13-ЛО (рис. 2б) може бути наслідком накопичення АБК за даних фізіологічних умов. Для перевірки цього припущення було досліджено ЛО активність в апікальній меристемі етіологованих проростків за дії екзогенної 10 мкМ АБК.

Динаміку змін активності 9-ЛО та 13-ЛО в апікальній меристемі проростків кукурудзи за дії 10 мкМ АБК представлено на рис. 3. Активність ферменту в меристемі контрольних рослин приймали за 100 %.

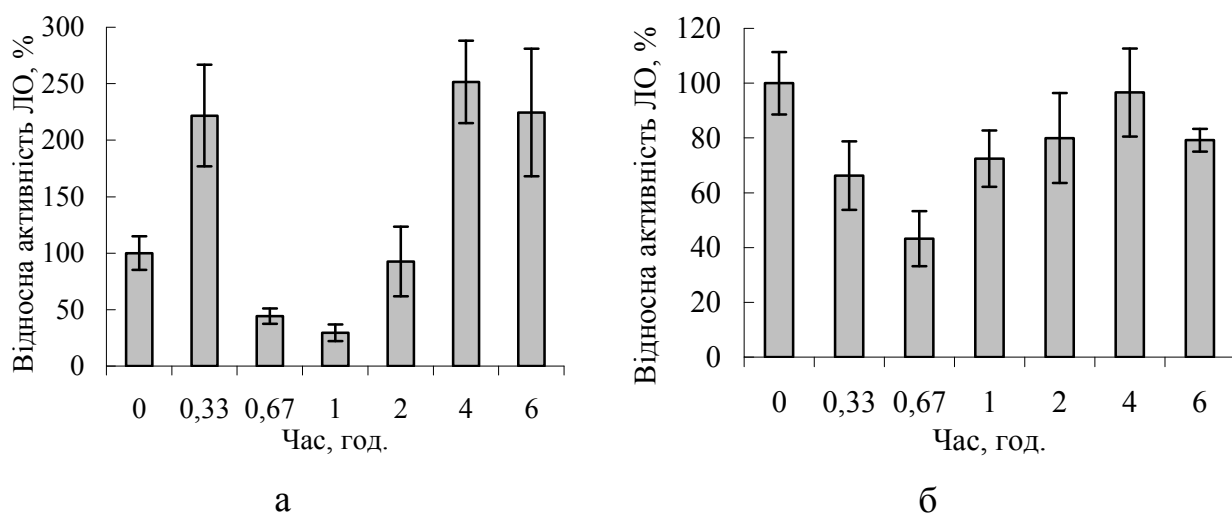


Рис. 3. Динаміка змін активності 9-ЛО (а) та 13-ЛО (б) в меристемі проростків кукурудзи за дії 10 мкМ абсцизової кислоти

Встановлено значне підвищення активності 9-ЛО (більш, ніж у два рази) на 0,33 годині дії АБК з одночасним різким зниженням активності 13-ЛО та суттєве зниження активності обох ЛО на 0,67-1 годину.

Активність 9-ЛО зменшується на 75 % від контрольного показника на 1 годину дії АБК, а на 4 і 6 годину – в 2-2,5 рази перевищує вихідну активність ферменту. Суттєвих змін в активності 13-ЛО на 2-6 годину дії гормону не спостерігається. Незначну кількість 13-ЛО метаболітів та підвищення частки 9-ЛО метаболітів також виявлено на ранніх етапах розвитку зародків кукурудзи за дії АБК [Abian J. et al., 1991].

Отже, за дії АБК динаміка змін активності 9-ЛО характеризується як підвищенням, так і зниженням відносно контролю, в той же час підвищення активності 13-ЛО не виявлено. Отримані нами відомості щодо функціонування ЛО за дії підвищеної концентрації солі та АБК свідчать про залучення цих ферментів в АБК-індуковану відповідь клітини. Активація 9-ЛО шляху синтезу оксиліпінів за дії АБК, як стресового гормону, вказує на взаємозв'язок двох сигнальних систем рослинної клітини та розширює існуючі на сьогоднішній день уявлення про функціональне значення цілої низки оксиліпінів, похідних 9-ЛО метаболітів, роль яких у метаболічних процесах рослинної клітини остаточно не з'ясована.

Вплив первинних продуктів 13-ліпоксигеназного окиснення лінолевої та арахідонової кислот на активність 9-ліпоксигенази за дії механічного ушкодження бульб картоплі. Стимулювання активності 9-ЛО та селективне пригнічення гідропероксидліазної ланки оксиліпінового шляху в умовах біотичних стресів показано в роботах [Gosset V. et al., 2009], [León-Morcillo R. J. et al., 2012], [Savchenko T. et al., 2013], [Tong X. et al., 2012]. Вважається, що відповідь рослинної клітини за таких умов обумовлена дією різних за хімічною будовою елісаторів, зокрема, арахідонової кислоти та її окиснених похідних [Savchenko T. et al., 2010], [Tarchevsky I.A., 2000], [Gosset V. et al., 2009].

З використанням моделей механічного ушкодження бульб картоплі проаналізовано вплив первинних продуктів 13-ЛО – 15-гідропероксиду арахідонової кислоти (15-ГПАК) та 13-гідропероксиду лінолевої кислоти (13-ГПЛК) на активність 9-ЛО. Встановлено значне підвищення активності 9-ЛО (рис 4, а) та швидкості біоконверсії 13-ГПЛК (рис. 4б) на 4 годину дії стресору. За дії 1 мкМ 15-ГПАК та механічного ушкодження бульб картоплі на 0,5 та 2 години активність 9-ЛО зростала, а на 4 годину суттєво знижувалась відносно контрольної (рис. 4а). Швидкість біоконверсії 13-ГПЛК ферментними препаратами знижувалася в усіх досліджених часових інтервалах (рис. 4б). Аналогічні результати були отримані за експозиції 1 мкМ 13-ГПЛК.

Таким чином, встановлено, що екзогенні 15-ГПАК та 13-ГПЛК на фоні адаптації рослинної клітини до механічного ушкодження на ранніх етапах стимулюють активність 9-ЛО, паралельно зменшуючи швидкість розщеплення гідропероксидів полієнових жирних кислот. Через 4-год дії

стресового чинника ефект дослідженої сполуки на 9-ЛО змінюється на протилежний, і спостерігається суттєве зниження активності як 9-ЛО, так і ферментів деградації первинних 13-ЛО продуктів.

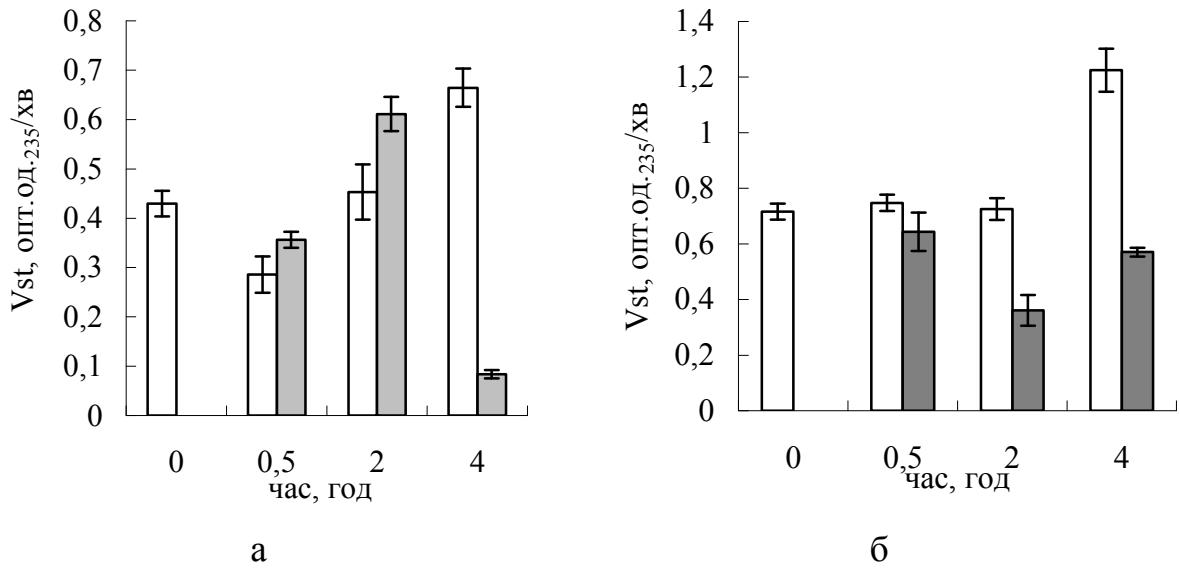


Рис. 4. Активність 9-ЛО (а) та швидкість біоконверсії гідропероксидів полієнових жирних кислот (б) за дії 1 мкМ 15-ГПАК в моделях механічного ушкодження бульб картоплі

Передбачається, що однією з причин коливання активності 9-ЛО може бути пряма взаємодія ферменту з фосфоліпідами клітинної мембрани, кількість яких у перші хвилини дії стресору зростає [Lee S. et al., 1997; Aziz, A. et al., 1998]. Так, відомо, що фосфатидна кислота (ФК) є ефективним алостеричним активатором ЛО з бульб картоплі [Skaterna T. D. et al., 2008], [Skaterna T. D. et al., 2010].

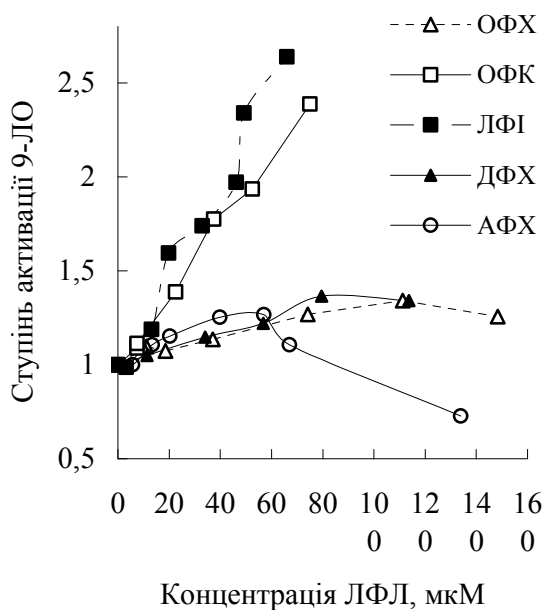


Рис. 5. Вплив ЛФЛ на ступінь активації 9-ЛО ($V_{st(LFL)} / V_{st}^0$)

На рис. 5 представлені результати вивчення впливу «маркерів» фізіологічних змін рослинної клітини – лізофосфоліпідів (ЛФЛ) різної структури на активність 9-ЛО з бульб картоплі. Виявилось, що лізофосфатидилхоліни (ЛФХ), у структурі яких ацильні залишки представлені олеїною (18:1) (ОФХ), арахідоною (20:5) (АФХ) та додеканною (12:0) (ДФХ) кислотами, підвищують швидкість окиснення лінолевої кислоти за каталітичної дії ферменту у 1,2-1,35 рази. При підвищенні концентрації АФХ активуючий ефект зникає, а сполука починає проявляти тенденцію до інгібування 9-ЛО.

Ще більший активуючий ефект проявляють кислі ліпіди – лізофосфатидилінозит (ЛФІ) та лізофосфатидна кислота (ОФК), ацильний залишок якої був представлений олеїною кислотою (рис. 5).

ЛФІ в концентрації 50 мкМ змінює форму субстратної залежності активності ферменту (рис.6)

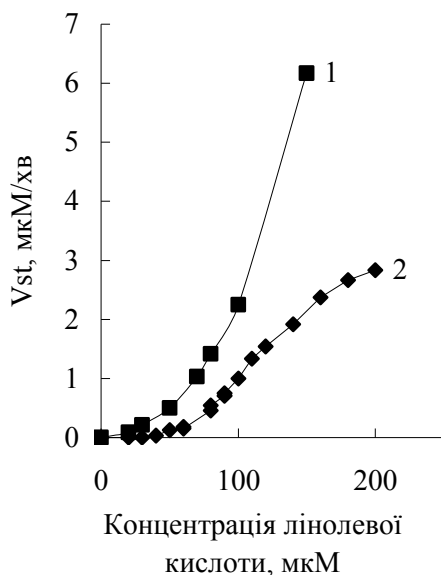


Рис. 6. Залежність активності 9-ЛО з бульб картоплі від концентрації лінолевої кислоти в присутності ЛФІ (1) та без активатора (2).

За дії 50 мкМ ЛФІ відбувається зменшення кількості приєднаних до ферменту молекул субстрату до 3-х, що обумовлено заміною лінолевої кислоти на ЛФІ в регуляторному центрі 9-ЛО. Встановлене нами збільшення максимальної швидкості ліпоксигеназної реакції (V_{max}) під впливом ЛФІ в десятки разів вище, ніж раніше було показано для алостеричного ефектору фермента – фосфатидилінозиту [Харитоненко Г.І. та ін., 2008].

Таблиця 1

Вплив ЛФІ на кінетичні параметри реакції окиснення лінолевої кислоти, що каталізується 9-ЛО з бульб картоплі

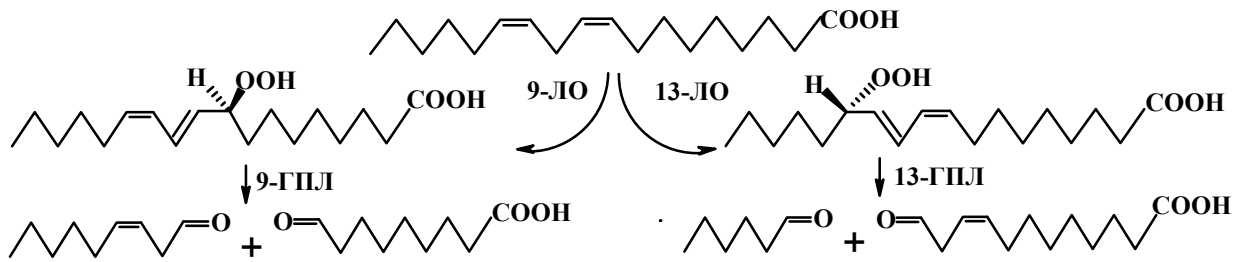
Умови реакції	V_{max} , мкМ / хв	$[S]_{0,5}$, мкМ	Коефіцієнт Хілла
50 мкМ ЛФІ	$114,04 \pm 25,8$	$484,685 \pm 52,130$	$2,444 \pm 0,052$
Без ЛФІ	$3,29 \pm 0,08$	$124,934 \pm 2,336$	$3,806 \pm 0,138$

Результати впливу ФК на біоконверсію 13-ГПЛК виявили здатність ФК в концентрації 10 мкМ знижувати швидкість процесу на 30 % від початкової. Таким чином, дія ФК може бути реалізована не тільки на рівні ключових ферментів 9-ЛО каскаду, а і на подальших стадіях ферментативного перетворення первинних ЛО продуктів. Отримані нами результати свідчать

про можливість залучення таких потужних біологічно-активних сполук як ЛФЛ та ФК до регуляції ЛО ферментативного каскаду.

Каталітичні властивості гідропероксидліази з проростків картоплі. Однією з ланок ЛО сигнальної системи є гідропероксидліази (ГПЛ; КФ 4.1.2.-) – ферменти, що каталізують перетворення первинних продуктів ЛО реакцій: 9-гідропероксинолевої та 9-гідропероксинолевої кислот у C_9 -альдегіди та C_9 -альдокислоти, та 13-гідропероксинолевої та 13-гідропероксинолевої кислот в C_6 -альдегіди та C_{12} -альдокислоти (схема 2).

Схема 2



Встановлено, що серед продуктів трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти (9- та 13-ГПЛК) безклітинними екстрактами з бульб картоплі є як 9-, так і 13-гідропероксидліазні продукти [Fausonnier M. L. et al., 2002]. На відміну від бульб, у листі картоплі виявляють лише 13-гідропероксидліазну активність [Vancanneyt G. et al., 2001], [Farmaki T. et al., 2007]. Для виділення гідропероксидліази використовували проростки картоплі, як рослинний матеріал з найвищою активністю ферменту. Залежності стаціонарної швидкості гідропероксидліазного розщеплення 9- та 13-ГПЛК від рН реакційного середовища представлено на рис. 7.

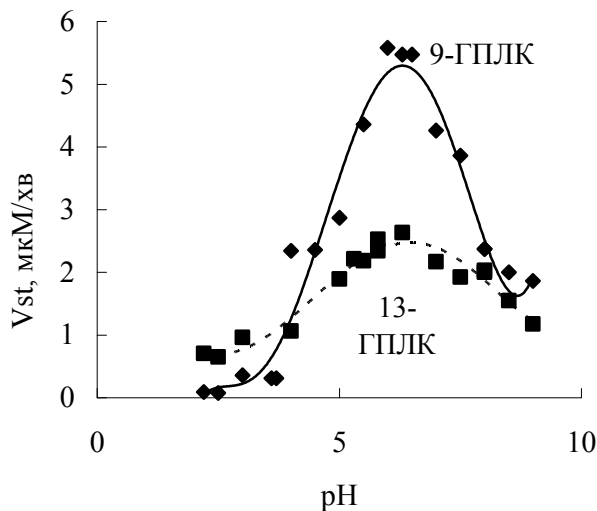


Рис.7. Залежність активності гідропероксидліази від рН реакційного середовища

Розрахунок проведено у відповідності з (f) рН-функцією Міхаеліса за рівнянням:

$$V_{st} = \frac{V_{opt}}{(1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+])} + c, \text{ де}$$

V_{st} – стаціонарна швидкість реакції,
 V_{opt} – стаціонарна швидкість реакції при оптимальному значенні рН,

K_1 і K_2 – константи дисоціації іоногенних груп ферменту,

c – експериментальна константа.

Оптимальні для протікання гідропероксидліазної трансформації 9- та 13-ГПЛК значення рН відповідно становили 6,3 та 6,5.

Дзвоноподібна форма кривих вказує на участь у реакції двох іоногенних груп ферменту з уявними значеннями рК, які наведені в табл.2.

Таблиця 2

Значення рК₁, рК₂, V_{opt} для гідропероксидліази з проростків картоплі

Значення параметру	Субстрат гідропероксидліази	
	9-ГПЛК	13-ГПЛК
рК ₁	8,03±0,14	8,51±0,13
рК ₂	4,61±0,16	4,49±0,18
V _{opt} , мкМ/хв	5,27±0,36	1,80±0,11
с, мкМ/хв	-	0,61±0,10

На рис. 8 представлено залежності активності гідропероксидліази від концентрації субстратів – 13- та 9-ГПЛК в реакційних сумішах, що містили: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3 та 6,5 відповідно для 9- та 13-ГПЛК), 0,02% Lubrol PX, 10-70 мкМ ГПЛК.

Результати розрахунку уявних констант Міхаеліса (K_м) та максимальної швидкості реакції (V_{max}) у відповідності до рівняння Міхаеліса-Ментен представлені в табл. 3.

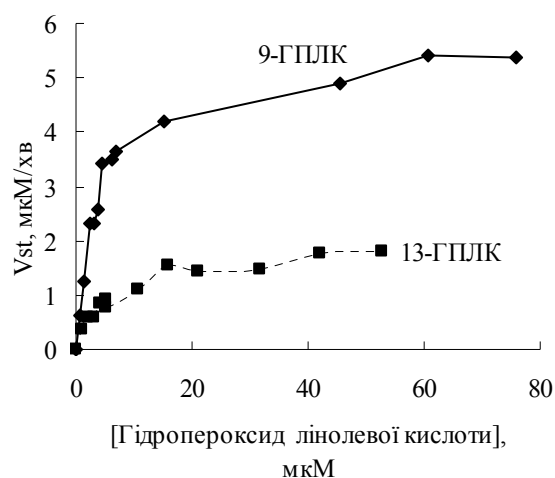


Рис.8. Залежність активності гідропероксидліази від кількості субстрату

Таблиця 3

Кінетичні характеристики гідропероксидліази з проростків картоплі

Кінетичний параметр	Субстрат ГПЛ реакції	
	9-ГПЛК	13-ГПЛК
K _м , мкМ	3,92±0,38	6,31 ±0,89
V _{max} , мкМ/хв	5,54±0,16	1,94±0,08

Значення уявних K_м у реакції розщеплення 9- та 13-ГПЛК, що каталізується гідропероксидліазою з проростків картоплі, співвідносяться з встановленим для гідропероксидліаз з інших рослинних джерел [Hornostaj A. R. et al., 2000], [Mu W. et al., 2012]. Даних щодо регуляторів активності гідропероксидліази в літературі на даний час небагато. Так, відомо про дію на фермент хлориду калію [Акаша N. B. et al., 2010], нордигідрогуарамової кислоти, HgCl₂ та 2(Е)-гексеналю [Long Z. et al., 2010]. Останній суттєво інгібує гідропероксидліазу та проявляє комплексну дію при взаємодії рослина-патоген, відновлюючи стійкість рослини до патогенної інфекції.

Про високу специфічність до субстратів реакції, притаманну гідропероксидліазі з проростків картоплі, свідчить встановлений нами факт неможливості гідролізу 9-гідропероксиду лінолевого спирту в присутності ферменту, що вказує на необхідність для протікання гідропероксидліазного каталізу наявності в структурі субстрату карбоксильної групи. Виявилося, що 9-гідропероксид лінолевого спирту суттєво блокує реакцію гідропероксидліазного перетворення гідропероксидів поліненасичених жирних кислот за умови попередньої інкубації з ферментом ($IC_{50}=20$ мкМ). Інhibуючий вплив на фермент здійснювала і фосфатидна кислота (10-50 мкМ). Отже, фосфатидна кислота здатна інhibувати активність гідропероксидліази і, таким чином, забезпечувати підтримання необхідного для клітини рівня первинних ЛО метаболітів.

Вперше, з проростків картоплі виділена та очищена гідропероксидліаза, що проявляє активність як по відношенню до 9- ГПЛК, так і до 13-ГПЛК, визначені кінетичні параметри гідропероксидліазної реакції, знайдені нові інhibітори ферменту – 9-гідропероксид лінолевого спирту та фосфатидна кислота. Отримані нами результати свідчать про участь фосфатидної кислоти в регуляції гідропероксидліазної ланки ЛО шляху утворення оксиліпінів, а також можуть бути використанні при розробці способів ферментативного синтезу 9- та 13-гідропероксидліазних метаболітів з метою дослідження їх біологічної активності.

Вплив brassinosteroidів на активність 9-ліпоксигенази з бульб картоплі в міцелярних системах *in vitro*. Деякі з рослинних ЛО, зокрема, ЛО з бульб картоплі, яка має структурно-функціональну подібність до 5-ЛО людини, використовують для первинного скринінгу інhibіторів [Арагоу Р. et al. 2008]. Досліджено вплив нового класу біорегуляторів стероїдної природи – brassinosteroidів (БС) на каталітичні властивості 9-ЛО з бульб картоплі. На рис. 9, 10 представлено залежності залишкової активності 9-ЛО від концентрації природних brassinosteroidів та їх синтетичних похідних.

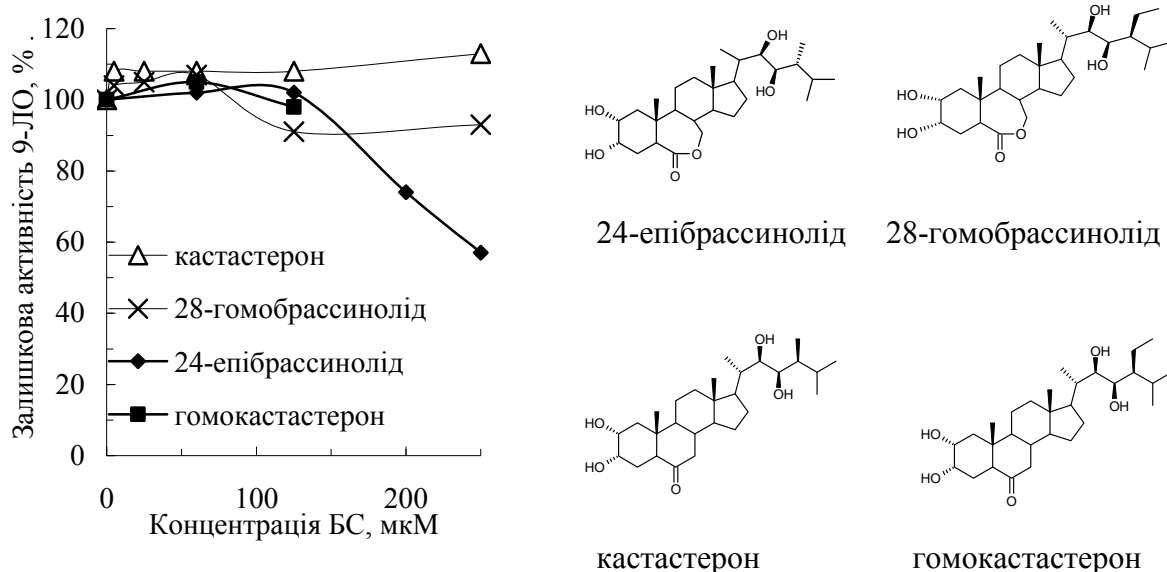


Рис. 9. Вплив природних brassinosteroidів на активність 9-ЛО

Ефективні, селективні інгібітори ЛО на основі природних сполук та їх синтетичних похідних можуть бути використані як сполуки, що корегують рівень ліпоксигеназних метаболітів.

Встановлено, що найбільший інгібуючий ефект серед природних БС на 9-ЛО проявляє 24-епібрасинолід. 28-Гомобрасинолід, кастастерон та гомокастастерон майже не впливали на активність ферменту (рис. 9).

Натомість сполука № 1 (рис. 10), що містить додаткову активну складову у вигляді залишку гетероауксину, є на порядок ефективнішою, ніж природний біорегулятор. 28-гомобрасинолід в концентраціях до 140 мкМ не впливає на активність 9-ЛО, модифікація цього БС залишками гетероауксину (сполука №3, рис. 10) значно підвищує інгібуючу активність по відношенню до ферменту ($IC_{50} = 36$ мкМ). Вплив сполуки №3 менше виражений, ніж для сполуки №2 (рис. 10), але теж суттєвий – $IC_{50} > 40$ мкМ. Таким чином, встановлено, що введення в структуру БС додаткових активних складових у вигляді залишків гетероауксину викликає зниження IC_{50} у реакції ліпоксигеназного каталізу.

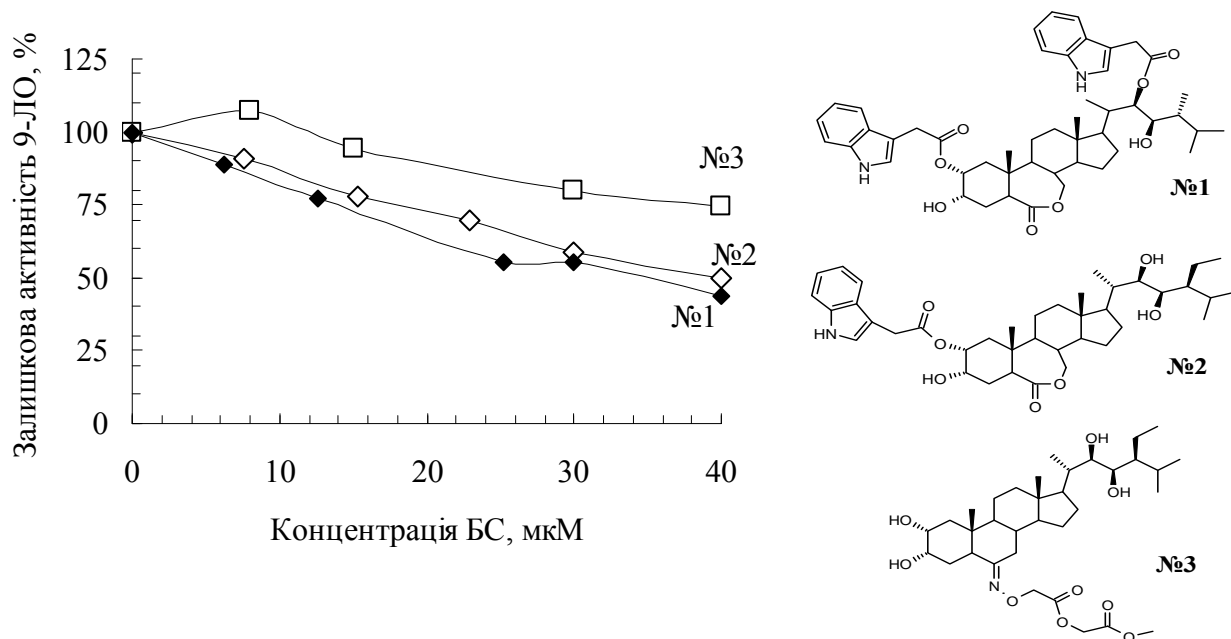


Рис. 10. Вплив синтетичних похідних брасиностероїдів на активність 9-ЛО:

№1 – 22R,23R,24R)-3 α ,23-дигідрокси-2 α ,22-ди-(3'-індолілацетокси)-24-метил-В-гомо-7-окса-5 α -холестан-6-он;

№2 – (22R,23R,24S)-3 α ,22,23-тригідрокси-2 α -(3'-індолілацетокси)-В-гомо-7-окса-24-етил-5 α -холест-6-он;

№3 – етиловий естер {{{(22R,23R,24R)-2 α ,3 α ,22,23-тетрагідрокси-24-метил-5 α -холест-6-іліденаміно)окси} оцтової кислоти.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що виявляється у використанні природних сполук та їх структурних аналогів в експериментальних системах з метою встановлення закономірностей прояву функціональної активності рослинних ліпоксигеназ.

1. Показано активуючу дію 24-епібрасиноліду на 9- ліпоксигеназу та 13-ліпоксигеназу в проростках кукурудзи *in vivo*. Встановлено, що в умовах холодного стресу стимулюючий ефект 24-епібрасиноліду на 9-ліпоксигеназу не змінюється, а на 13-ліпоксигеназу суттєво зростає порівняно з дією сполуки за нормальних умов.

2. Продемонстровано за дії абсцизової кислоти різноспрямований характер змін в активності 9-ліпоксигенази та 13-ліпоксигенази в проростках кукурудзи *in vivo*. Виявлено стимулюючий ефект абсцизової кислоти на активність 9-ліпоксигенази та відсутність активуючої дії сполуки на 13-ліпоксигеназу.

3. Встановлено інгібуючий вплив первинних 13-ліпоксигеназних продуктів на функціональну активність 9-ліпоксигенази та швидкість біоконверсії гідропероксидів полієнових жирних кислот при механічному ушкодженні бульб картоплі *in vivo*.

4. Показано, що лізофосфатидилінозит та лізофосфатидна кислота є активаторами 9-ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти в міцелярних системах *in vitro*.

5. Встановлено субстратну специфічність гідропероксидліази з проростків картоплі. Знайдено нові інгібітори ферменту – 9-гідропероксид лінолевого спирту та фосфатидну кислоту.

6. Встановлено, що введення в структуру 24-епібрасиноліду залишку гетероауксину викликає зниження IC_{50} на порядок при інгібуванні реакції ліпоксигеназного каталізу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kopich V.N. Effect of 24-epibrassinolide on lipoxygenase activity in maize seedlings under cold stress / V.N. Kopich, S.V. Kretynin, O.V. Kharchenko, R.P. Litvinovskaya, N.M. Chashina, V.A. Khripach // *Biopolym. Cell.* – 2010. – №3. – P. 218-224.
2. Копіч В.М. Вивчення впливу сольового стресу та абсцизової кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи / В.М. Копіч, О.В Харченко // *Доповіді НАН України.* – 2011. – № 12. – С. 148-152.
3. Копіч В.М. Каталітичні властивості гідропероксидліази з проростків картоплі / В.М. Копіч, О.В Харченко // *Доповіді НАН України.* – 2015. – №5. – С. 158-164.
4. Skaterna T.D. Lipoxygenase regulation *in vivo* and *in vitro* under lipid nature compounds / T.D. Skaterna, V.N. Kopich, G.I. Kharitonenko, O.V. Kharchenko // *Biopolym. Cell.* – 2015. – №3. – P. 161 – 173.
5. Копіч В.М. Вивчення впливу механічного пошкодження та первинних ліпоксигеназних продуктів на активність ліпоксигенази з бульб картоплі. /

В.М. Копіч, Г.І. Харитоненко, Т.Д. Скатерна, О.В Харченко // Доповіді НАН України. – 2015. – № 9. – С. 98-104.

6. Копич В.Н. Липоксигеназная и гидропероксидлиазная активность при хранении и прорастании клубней картофеля (*Solanum tuberosum L.*) / В.Н. Копич, О.В Харченко // Межд. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Материалы докладов. – Сыктывкар, Россия. – 2007. – С. 96-97.

7. Харченко О.В. Кинетические особенности ферментативного окисления линолевого спирта в присутствии 5-липоксигеназы клубней картофеля (*Solanum tuberosum L.*) / О.В. Харченко, М.Г. Казачков, Т.Д. Скатерная, А.И. Харитоненко, В.Н. Копич // Межд. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Материалы докладов. – Сыктывкар, Россия. – 2007. – С. 153-154.

8. Kopich V.N. Changes of lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities during storage and germination of potato tubers (*Solanum tuberosum L.*) / V.N. Kopich, O.V. Kharchenko // Abstr. of 2nd International Symposium Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture. – Kyiv, Ukraine. – 2007. – P. 88.

9. Kharchenko O.V. Effect of cold stress and 24-epibrassinolide on lipoxygenase activity in maize seedlings / O.V. Kharchenko, V.N. Kopich, S.V. Kretynin, R.P. Litvinovskaya, V.A. Khripach // Abstr. of 2nd International Symposium Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture. – Kyiv, Ukraine. – 2007. – P. 75.

10. Копіч В.М. Липоксигеназна активність з проростків кукурудзи в умовах осмотичного стресу / В.М. Копіч, О.В Харченко // Тези ХХІV наукової конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії ИБОНХ НАНУ. – Каталіз та нафтохімія. – 2009. – №17. – С.110.

11. Копич В.Н. Поиск эффективных и селективных ингибиторов 5- и 15-липоксигеназ в группе новых производных растительных гормонов / В.Н. Копич, О.В. Харченко, Р.П. Литвиновская, М.Э. Райман, П.С. Минин // Тезисы ХХVI научной конференции по биоорганической химии и нефтехимии ИБОНХ НАНУ. – Каталіз и нефтехимия. – 2011. – № 19. – С. 108.

12. Kopich V.M. Development model system for determining of influence of physiological activity substances on key enzymes of oxilipin synthesis / V.M. Kopich, G.I. Kharitonenko, T.D. Skaterna, O.V. Kharchenko // Тезисы ХХІХ научной конференции по биоорганической химии и нефтехимии ИБОНХ НАНУ. – Каталіз и нефтехимия. – 2014. – № 23. – С. 101.

13. Kopich V.M. Oxygenation of linoleic acid by lipoxygenase from *Zea mays l.* in model of biological membrane / V.M. Kopich, O.V. Kharchenko // Abstr. of II Ukrainian-Polish scientific conference “Membrane and sorption processes and technologies”. – 2015. – Kyiv, Ukraine. – P. 111-112.

АНОТАЦІЯ

Копіч В.М. – Функціонування ліпоксигеназ під впливом рослинних гормонів та ліпоксигеназних метаболітів. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, 2016.

В модельних системах *in vitro* та *in vivo* досліджено вплив brassinosteroidів, абсцизової кислоти, лізофосфоліпідів, фосфатидної кислоти, 13-гідропероксиду лінолевої кислоти, 15-гідропероксиду арахідонової кислоти на активність 9- та 13-ліпоксигеназ рослин – ключових ферментів синтезу оксиліпінів. Встановлено суттєві зміни в активності 9- та 13-ліпоксигеназ за дії низької температури, підвищеної концентрації солі, 1 мкМ 24-епібрасинолідів і 10 мкМ абсцизової кислоти. В модельних системах механічного ушкодження бульб картоплі *in vivo* за дії 1 мкМ 13-гідропероксиду лінолевої кислоти або 15-гідропероксиду арахідонової кислоти встановлено суттєве зниження швидкостей процесів ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти та біотрансформації 13-гідропероксидів лінолевої кислоти. Показано, що лізофосфатидилінозит та лізофосфатидна кислота – потужні активатори 9-ліпоксигенази в міцелярних системах *in vitro*. Виявлено інгібуючий вплив 10 мкМ фосфатидної кислоти на біотрансформацію 13-гідропероксидів лінолевої кислоти. Розроблено метод отримання гідропероксидліази з проростків картоплі, визначено кінетичні параметри гідропероксидліазного розщеплення 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти. Знайдено нові інгібітори гідропероксидліазної реакції – 9-гідропероксид лінолевого спирту ($IC_{50} = 20$ мкМ) та фосфатидна кислота. Встановлено, що введення в структуру 24-епібрасинолідів додаткової активної складової у вигляді залишку гетероауксину викликає зниження IC_{50} на порядок при інгібуванні реакції ліпоксигеназного каталізу. Отримані результати вказують на можливість залучення лізофосфоліпідів, brassinosteroidів, первинних ліпоксигеназних метаболітів до регуляції ліпоксигеназного ферментативного каскаду та на зв'язок між декількома сигнальними шляхами рослинної клітини.

Ключові слова: ліпоксигеназа, 24-епібрасинолід, абсцизова кислота, лізофосфатидилінозит, лізофосфатидна кислота, фосфатидна кислота, абіотичний стресор, гідропероксидліаза

АННОТАЦИЯ

Копич В.Н. – Функционирование липоксигеназ под воздействием растительных гормонов и липоксигеназных метаболитов. – Рукопись

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия. – Институт биорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 2016.

В модельных системах *in vitro* и *in vivo* исследовано влияние brassinosteroidов, абсцизової кислоти, лизофосфолипидов, фосфатидной кислоты, 13-гидропероксида линолевой кислоты, 15-гидропероксида

арахидоновой кислоты на активность 9- и 13-липоксигеназ растений – ключевых ферментов синтеза оксипинов. Установлены существенные изменения в активности 9- и 13-липоксигеназ под действием низкой температуры, повышенной концентрации соли, экзогенных 1 мкМ 24-эпибрассинолида и 10 мкМ абсцизовой кислоты. В модельных системах механического ранения клубней картофеля *in vivo* в присутствии 1 мкМ 13-гидропероксида линолевой кислоты или 15-гидропероксида арахидоновой кислоты установлено существенное снижение скорости липоксигеназного окисления линолевой кислоты и биотрансформации 13-гидропероксида линолевой кислоты. Показано, что лизофосфатидилинозит и лизофосфатидная кислота – мощные активаторы 9-липоксигеназы в мицеллярных системах *in vitro*. Выявлено ингибирующее влияние 10 мкМ фосфатидной кислоты на биотрансформацию 13-гидропероксидов линолевой кислоты. Разработан метод получения гидропероксидлиазы из проростков картофеля, определены кинетические параметры гидропероксидлиазного расщепления 9- и 13-гидропероксидов линолевой кислоты. Найдены новые ингибиторы гидропероксидлиазы – 9-гидропероксид линолевого спирта ($IC_{50} = 20$ мкМ) и фосфатидная кислота. Установлено, что введение в структуру 24-эпибрассинолида дополнительной активной составляющей в виде остатка гетероауксина вызывает снижение IC_{50} на порядок при ингибировании реакции липоксигеназного катализа. Полученные результаты указывают на возможность вовлечения лизофосфолипидов, брассиностероидов, первичных липоксигеназных метаболитов в регуляцию липоксигеназного ферментативного каскада и на связь нескольких сигнальных путей растительной клетки.

Ключевые слова: липоксигеназа, 24-эпибрассинолид, абсцизовая кислота, лизофосфатидилинозит, лизофосфатидная кислота, фосфатидная кислота, абиотический стрессор, гидропероксидлиаза.

SUMMARY

Kopich V.M. – Lipoxygenase functioning under the influence of plant hormones and lipoxygenase metabolites

The dissertation for the candidate of biological science degree in speciality 02.00.10 – bioorganic chemistry. – Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

This thesis is a complex research devoted to establish influence of natural compounds and synthetic derivatives on lipoxygenase activity *in vitro* and *in vivo*.

Biological significance of the lipoxygenase pathway products in living organisms explains an interest paid to the research on regulation mechanisms of this key enzyme and a possibility to correct the level of lipoxygenase metabolites. Lipoxygenases (EC 1.13.11.- ; LO) are the enzymes of lipid metabolism, which catalyze the oxygen insertion into the 1,4-cis,cis-pentadiene fragment of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with production of the corresponding hydroperoxide derivatives. The LO products of PUFAs oxidation pathways are

involved in the apoptosis and cell proliferation, metabolism and transportation, cell-cell interactions and inflammatory processes. The quantitative and qualitative composition of LO metabolites changes at various pathological conditions of animal, human and plant cells during the adaptation to environmental factors and at the conditions of intense growth and development.

The purpose of this thesis is to analyze the participation of LO products of PUFAs oxidation pathways in plant cells during the adaptation to environmental factors *in vivo* with further research *in vitro*.

Six tasks are needed to be fulfilled in order to realize the above mentioned purpose: study of the effect of a number of compounds such as (1) brassinosteroids, (2) abscisic acid, (3) lysophospholipids, (4) phosphatidic acid, (5) 13-hydroperoxy-linoleic acid, (6) 15-hydroperoxy-arachidonic acid on key enzymes of oxylipin synthesis 9- and 13- LO *in vivo* and *in vitro*.

There are six points considered as most significant outcomes in the thesis:

- influence of 24-epibrassinolide on the 9- and 13-LO activities isolated from maize seedling mesocotyl under normal conditions and cold stress; it was established that 0.01 or 1.0 μM 24-epibrassinolide treatment induced at normal conditions 3- or 6-fold increase 9- and 13-LO activities in the mesocotyl respectively; cold stress enhanced the activity of 9-LO by 4 times comparing with control in the presence of 24-epibrassinolide, whereas 10-fold elevation of the 13-LO activity has been observed as a result of treatment with 1 mM 24-epibrassinolide;

- salt stress and abscisic acid influenced on the maize LO activity (9- and 13-LO); a changing of the 9- and 13-LO activities under the action of abscisic acid and salt stress performed a compensatory effect; the compensatory effect of the 9- and 13-LO activities changing under the action of salt stress may provide part of the LO system to adaptation of the plant cell;

- the influence oxidized by LO PUFAs 15-hydroperoxy-arachidonic acid and 13-hydroperoxy-linoleic acid on the potato LO activity in model systems of mechanical wounding; it was established a significant decrease of LO oxidation velocity and biotransformation of 13-hydroperoxy-linoleic acid in model systems of mechanical wounding on potato tubers *in vivo* under conditions of exogenous 1 μM 13-hydroperoxy-linoleic acid application; it was determined the inhibitory effect of 10 μM phosphatidic acid on 13-hydroperoxy-linoleic acid biotransformation;

- the influence of brassinosteroids and lysophospholipids on potato LO activity in the micelles system *in vitro* was studied; introduction to the structure of 24-epibrassinolide additional active ingredient in the form of balance heteroauxin decreased the IC₅₀ on the order in inhibition of LO reaction catalysis; determined value V_{max} , $[S]_{0,5}$ and h for lipoxygenase oxidation of linoleic acid with and without of 50 μM lysophosphatidylinositol are $114,04 \pm 25,8$ and $3,29 \pm 0,08$ $\mu\text{mole}/\text{min}$; $0,48 \pm 0,05$ and $0,12 \pm 0,002$ mM; $2,44 \pm 0,05$ and $3,81 \pm 0,14$ respectively;

- catalytic properties of hydroperoxide lyase (HPL) from potato seedlings was

studied; HPL was extracted from potato seedlings and purified by centrifugation, solubilisation with detergent, ammonium sulphate precipitation, and ion-exchange chromatography; pH 6.3 and 6.5 were optimum for the lysis of 9-hydroperoxy-linoleic acid and 13-hydroperoxy-linoleic acid substrates, respectively; the substrate specificity of the DEAE-Toyopearl-purified HPL was determined by examining the activities of the HPL with 9-hydroperoxy-linoleic acid, 9-hydroperoxy-linoleic alcohol and 13-hydroperoxy-linoleic acid; apparent K_M values for 9-hydroperoxy-linoleic acid and 13-hydroperoxy-linoleic acid were 3.92 and 6.31 μM ; corresponding V_{max} values were 5.54 and 1.94 $\mu\text{M}/\text{min}$; 9-hydroperoxy-linoleic alcohol inhibits HPL with an IC_{50} of 20 μM ; phosphatidic acid inhibited HPL by about 40 % at 50 μM indicating the role of this phospholipid in the maintenance of cellular levels of lipid hydroperoxides.

In summary, 24-epibrassinolide, abscisic acid, 15-hydroperoxy-arachidonic acid, 13-hydroperoxy-linoleic acid - induced changes in the 9- and 13-LO activities are evidences of the initiation of the entire complex of cell signal systems, in particular, the LO-signal system. This can provide realization of the anti-stress program during plant adaptation against harmful environmental conditions.

Key words: lipoxygenase, 24-epibrassinolide, abscisic acid, lysophosphatidylinositol, lysophosphatidic acid, phosphatidic acid, abiotic stressor, hydroperoxide lyase