

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

На правах рукопису

Копіч Віктор Миколайович

УДК 577.152.1: 577.325.6

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

02.00.10 – біоорганічна хімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник
Харченко Ольга Володимирівна

Київ-2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Загальна характеристика ліпоксигеназ	12
1.1.1 Номенклатура та класифікація ліпоксигеназ	12
1.1.2 Структура ліпоксигеназ	17
1.1.3 Каталітичний механізм ліпоксигеназ	19
1.2 Ліпоксигеназний шлях окиснення поліненасичених жирних кислот	23
1.3 Участь ліпоксигеназ в адаптації рослинної клітини до абіотичних та біотичних стресів	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	39
2.1. Матеріали	39
2.2. Методи	39
2.2.1. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини за дії 24-епібрасиноліду та низьких температур	39
2.2.2. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини за дії хлористого натрію та абсцизової кислоти	40
2.2.3. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні	40

2.2.4 Виділення ліпоксигеназ з проростків кукурудзи	40
2.2.5. Визначення активності ліпоксигеназ кукурудзи	41
2.2.6. Вивчення впливу фосфатидної кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи	42
2.2.7. Визначення впливу brassinosteroidів та їх похідних на 9-ліпоксигеназу з бульб картоплі <i>in vitro</i>	42
2.2.8. Вивчення впливу лізофосфоліпідів на активність 9-ліпоксигенази з бульб картоплі	43
2.2.9. Ферментативний синтез 9-гідропероксиду лінолевої кислоти та лінолевого спирту	44
2.2.10. Ферментативний синтез 13-гідропероксиду лінолевої кислоти	45
2.2.11. Ферментативний синтез 15-гідропероксиду арахідонової кислоти	46
2.2.12. Визначення чистоти гідропероксидів полієнових жирних кислот із використанням обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії	47
2.2.13. Дослідження впливу гідропероксидів полієнових жирних кислот на активність ліпоксигеназ в модельних системах, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні бульб картоплі	47
2.2.14. Визначення активності гідропероксидліази картоплі	48
2.2.15. Математична обробка результатів дослідів	49
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	50
3.1. Вплив 24-епібрасиноліду на ліпоксигенази в проростках кукурудзи за дії низьких температур	50

3.2. Порівняльне дослідження дії сольового стресора та абсцизової кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи	67
3.3 Вплив первинних продуктів 13-ліпоксигеназного окиснення лінолевої та арахідонової кислот на активність 9-ліпоксигенази за дії механічного ушкодження бульб картоплі	75
3.4 Каталітичні властивості гідропероксидліази з проростків картоплі	85
3.5 Вплив брассиностероїдів на активність 9-ліпоксигенази з бульб картоплі в міцелярних системах <i>in vitro</i>	94
ВИСНОВКИ	103
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	105

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБК – абсцизова кислота

ГП – гідропероксид

ГПЛК – гідропероксид лінолевої кислоти

ЛО – ліпоксигеназа

ЛК – ліолева кислота

ЛС – ліолевий спирт

ПНЖК – поліненасичена жирна кислота

V_{st} – стаціонарна швидкість реакції

ЛФЕ - лізофосфатидилетаноламін

ЛФХ - лізофосфатидилхолін

ЛФІ - лізофосфатидилінозит

ЛФК - лізофосфатидна кислота

БС - brassinosteroids

ІОК - індолілоцтова кислота

ККМ- критична концентрація міцелоутворення

ФК – фосфатидна кислота

24-ЕБР – 24-епібрасинолід

ВСТУП

Актуальність теми. Ліпоксигенази (лінолеат:кисень оксидоредуктази, КФ 1.13.11.-.) - ферменти ліпідного обміну, які каталізують регіо- та стереоспецифічне введення молекулярного кисню до 1,4-цис,цис-пентадієнового фрагменту поліненасичених жирних кислот, що призводить до утворення відповідних гідропероксидів [1, 2]. Ця реакція є ключовою у ліпоксигеназному каскаді та веде до утворення біологічно активних речовин - оксиліпінів, які забезпечують відповідь рослини на дію патогенів, засолення, низьку температуру, ушкодження та залученні в процесах росту, розвитку та старіння. [3-7]. Несприятливі фактори середовища (засолення або затоплення ґрунтів, водний дефіцит, посуха, низька температура) змінюють напрям метаболічних процесів та активують захисні механізми рослинної клітини. В умовах сольового стресу у рослин зростає рівень АБК, а при дії позитивної низької температури – брассиностероїдів. Є окремі дані про вплив цих гормонів на рослинні ліпокигенази [8, 9], але практично немає відомостей про прояв функціональної активності певних гілок 9- та 13-ліпокигеназного 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 каскаду поліненасичених жирних кислот в сільському господарстві та промисловості. Встановлення механізмів регуляції ліпоксигеназної активності і пошук нових ефективних інгібіторів і активаторів ферменту серед природних сполук приведе до створення нових технологічних засобів регуляції функціональної адаптації рослин до різких змін умов оточуючого

середовища. Продукти ліпоксигеназних шляхів окиснення поліненасичених жирних кислот - різноманітні сигнальні сполуки, лейкотрієни і ліпоксини тварин, простагландин-подібні ліпоксигеназні метаболіти коралів, лактони мікроорганізмів, жасмонати рослин та ін. Вони задіяні в апоптозі та проліферації клітин, метаболізмі і транспорті, міжклітинних взаємодіях та запальних процесах. Зміни кількісного та якісного складу ліпоксигеназних метаболітів характерні для різних патологічних станів тварин, людини, а також для рослинної клітини при адаптації до факторів зовнішнього середовища та в умовах інтенсивного росту та розвитку. Це обумовлює актуальність пошуку нових речовин - регуляторів активності ліпоксигеназ.

На даний час рослинні гормони - брассиностероїди (БС) та абсцизова кислота (АБК) досліджуються як потенційні лікарські засоби з антиканцерогенною, антипроліферативною, антивірусною, анти СНІД-активністю [10-12]. Нажаль на даний час досить мало відомостей про молекулярні механізми позитивного впливу фітогормонів на тваринні організми. Пошук гідрофобних сполук у водному середовищі для біологічних систем не є незвичайним: відомо, що кров людини містить різні ліпіди, багато з яких грають важливу роль у здоров'ї людини. Серед природних регуляторів активності ліпоксигеназ ліпідного походження - фосфатидна кислота (ФК), фосфатидилінозитол, фосфатидилхолін, гліцерили - сполуки, що входять до складу клітинних мембран.

Вибір експериментальних моделей для тестування природних сполук рослинного походження (зокрема, рослинних гормонів) як регуляторів каталітичної активності ліпоксигеназ може ґрунтуватись як на моделях, що імітують біологічну мембрану *in vitro*, так і на експериментальних моделях функціональних змін в рослинній клітині *in vivo* за умов дії зовнішніх подразників та введення екзогенних сполук.

Дані підходи перспективні для вирішення завдань, пов'язаних з регуляцією рівня ліпоксигеназних продуктів та скринінгу фізіологічно активних сполук нового покоління, яким притаманні властивості регуляторів росту та імуномодуляторів.

Дослідження дії рослинних гормонів та їх похідних, а також ліпоксигеназних метаболітів як сполук, що можуть впливати на функціонування ліпоксигеназ *in vivo* та *in vitro*, є актуальним для встановлення загальних закономірностей протікання ліпоксигеназних реакцій в живій клітині та факторів, що обумовлюють даний процес.

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-епібрасиноліду 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 brassinosteroidів 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 високоефективна 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-епібрасиноліду 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-епібрасиноліду 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 брасиностероїдів. 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 brassinosteroids та їх синтетичні похідні синтезовані у відділі Хімії стероїдів ІБОХ НАН Білорусі під керівництвом академіка Хріпача 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 pp.), Міжнародній конференції „Современная физиология растений: от молекул до экосистем” (Сиктивкар, Росія 2007), 2-му міжнародному симпозіумі «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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика ліпоксигеназ

Ліпоксигенази (ЛО) – лінолеат:кисень оксидоредуктази, КФ 1.13.11._. – ферменти ліпідного обміну, які каталізують введення гідроперекисної групи до 1,4-цис,цис-пентадієнового фрагменту поліненасичених жирних кислот (ПНЖК, рис.1.1) [13].

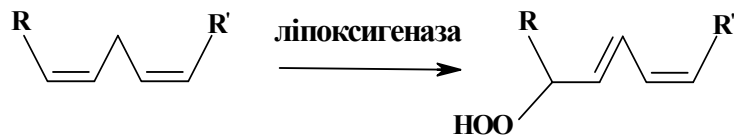


Рис. 1.1. Ліпоксигеназна реакція окиснення ПНЖК

Ліпоксигенази широко поширені в рослинах та тваринах, деяких морських організмах, грибах або у бактеріях [5, 14-17].

1.1.1. Номенклатура та класифікація ліпоксигеназ

Систематична та тривіальна номенклатура ЛО.

Згідно із систематичною номенклатурою, назва ферменту складається з хімічної назви субстрату або субстратів; типу реакції, що каталізується ферментом, та суфіксу -аза. Так, ліпоксигенази за субстратом реакції (лінолева або арахідонова кислота) класифікують як лінолеат:кисень оксидоредуктази або арахідонат:кисень оксидоредуктази. В таблиці 1.1. наведено приклади сучасної класифікації ліпоксигеназ.

Таблиця 1.1.

Приклади сучасної класифікації ліпоксигеназ

Шифр КФ	Фермент	Повна назва
КФ 1.13.11.12	лінолеат 13-ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 13-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.31	арахідонат 12-ліпоксигеназа	(арахідонат:кисень 12-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.33	арахідонат 15-ліпоксигеназа	(арахідонат:кисень 15-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.34	арахідонат 5-ліпоксигеназа	(арахідонат:кисень 5-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.40	арахідонат 8-ліпоксигеназа	(арахідонат:кисень 8-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.45	лінолеат 11-ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 11-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.58	лінолеат 9S-ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 9S-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.60	лінолеат 8R-ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 8R-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.61	лінолеат 9R -ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 9R-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.62	лінолеат 10R -ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 10R-оксидоредуктаза)
КФ 1.13.11.B6	лінолеат 9/13-ліпоксигеназа	(лінолеат:кисень 9/13-оксидоредуктаза)

Тривіальні назви ферментів утворюються на основі хімічної назви субстрату з додаванням суфікса -аза. У біохімії існують також загальноприйняті, історично усталені назви ферментів, що не відображають хімічної природи реакції. Для рослинних ліпоксигеназ зустрічаються такі тривіальні назви - ліпопероксидаза, ліпоксидаза, каротин оксидаза та ін.

В основі класифікації ліпоксигеназ - порядковий номер вуглецю у молекулі субстрату, до якого фермент приєднує гідроперекисну групу. Для рослинних ліпоксигеназ пропонується класифікація ферментів відносно лінолевої ($C_{18:2}$) або ліноленової ($C_{18:3}$) кислот, а для ліпоксигеназ з тварин – відносно арахідонової кислоти ($C_{20:5}$). Таким чином, в залежності від кінцевих продуктів ліпоксигеназної реакції рослинні ферменти відносно лінолевої ($C_{18:2}$) кислоти, що окиснюється до двох ключових продуктів 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти, називають відповідно 9- та 13-ліпоксигенази (9-ліпоксигеназа: окиснення відбувається у C_9 положенні; 13-ліпоксигеназа: окиснення відбувається у C_{13} положенні, рис. 1.2) [18]. Ліпоксигенази з тварин поділяють на 5-, 8-, 9-, 11-, 12- та 15-ліпоксигенази [19] відносно арахідонової кислоти. Крім того існує класифікація, заснована на стереоспецифічності окиснених продуктів ліпоксигеназної реакції (наприклад, 12S-ліпоксигеназа або 12R-ліпоксигеназа).

У деяких видів рослин, таких як картопля або соя, ідентифіковані ліпоксигенази з подвійною специфічністю, що можуть окиснювати лінолеву кислоту в двох положеннях - C_9 та C_{13} - 9/13-ліпоксигенази [20].

Класифікація по виду організму, в якому присутня відповідна ліпоксигеназа рослин: 13-ліпоксигеназа з сої – соєва ліпоксигеназа, ліпоксигенази з тварин: 5-ліпоксигеназа людини, 15-ліпоксигеназа кролика та ін.

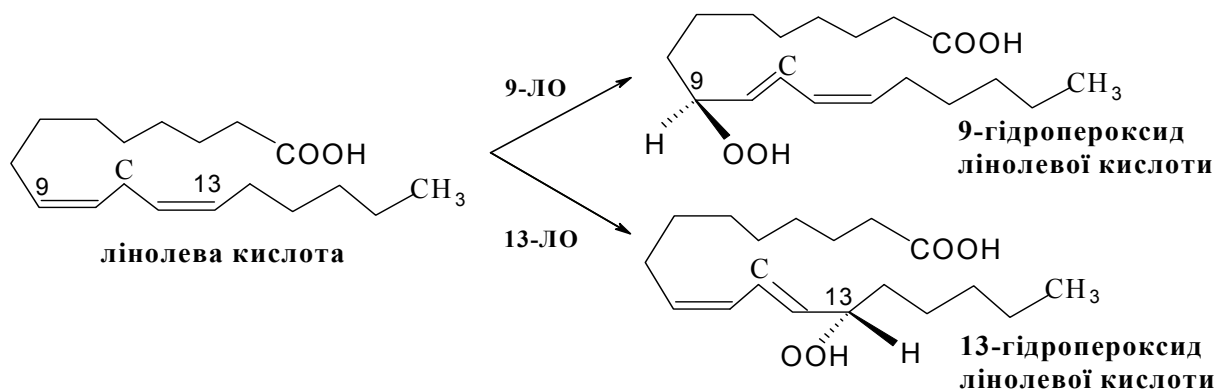


Рис. 1.2. Позиційна специфічність ліпоксигеназ

Позиційна специфічність ліпоксигеназ дуже висока, вона є основою, на якій базується класифікація ліпоксигеназ в живих організмах. Тим не менш існує загальна проблема в сучасному іменуванні ліпоксигенази, оскільки фермент може окиснювати різні субстрати – внаслідок чого спостерігаються зміни у відносній позиційній специфічності (наприклад, лінолеат 9-ліпоксигеназа та арахідонат 5-ліпоксигеназа).

Ліпоксигенази також поділяють на ω -6 ферменти по позиції вуглецю в молекулі субстрату вважаючи від карбоксильної групи полієнової жирної кислоти. Так, рослинні 13-ліпоксигенази називають лінолеат ω 6-ліпоксигенази, тваринні 15-ліпоксигенази - арахідонат ω 6-ліпоксигенази. Ряд рослинних ліпоксигеназ подібні за властивостями до тваринних ліпоксигеназ та часто використовуються як моделі тваринних ліпоксигеназ в інгібіторному аналізі (9-ліпоксигеназа з картоплі аналог: 5-ліпоксигенази, 13-ліпоксигеназа з сої - аналог: 15-ліпоксигенази) [21-23].

Крім того, часто можна знайти більше одного типу ліпоксигенази в тому ж виді організму. У *Arabidopsis* серед ферментів ліпоксигеназ визначено дві 9-ліпоксигенази (LOX1 і LOX5) і чотири 13-ліпоксигенази

(LOX2, 3, 4 і 6). У рослини картоплі відомо 14 генів, що належать до ферментів - ліпоксигеназ [15].

➤ *Класифікація по локалізації в організмі*

Ліпоксигенази, які мають однакову позиційну специфічність, на додаток можна класифікувати по відношенню до тканини і клітин, в яких вони були виявлені (наприклад, тромбоцитарна 12-ліпоксигеназа, лейкоцитарна 12-ліпоксигеназа, 12-ліпоксигеназа епідермісу і т.д.).

Ліпоксигенази відносяться переважно до цитоплазматичних ферментів [3]. Ізоформи ліпоксигеназ були також знайдені в різних органелах, клітинах та їх частинах: в мітохондріях, вакуолі, в ядрі, в ліпосомах/ліпідних агрегатах, зв'язаних з мікросомальними і плазматичними мембранами, в хлоропластах. Ліпоксигенази присутні в хлоропластах різних видів рослин, як в розчинних, так і мембранозв'язаних станах. Локалізація ферментів ліпоксигеназ сильно варіює. До цих пір ліпоксигенази ділять на цитозольні та вакуольні, ліпоксигенази з хлоропластів, як приклад мембранозв'язаних ферментів [15]. Таке широке розповсюдження ізоформ ліпоксигеназ в клітині свідчить про багатогранність функцій ліпоксигеназ.

Ліпоксигенази - це мономерні білки, які розрізняються за субстратною специфічністю, вибірковістю, молекулярною масою і рН-оптимумом.

Інша можлива класифікація ліпоксигеназ в залежності від рН-оптимуму - ліпоксигеназа 1: рН-оптимум 9 од. рН; ліпоксигеназа 2: рН-оптимум 7 од. рН.

Розшифровка все більшої кількості нових послідовностей геному допомагає визначенню нових ізоформ ліпоксигенази. Однак амінокислотні послідовності з високим ступенем гомології не

обов'язково свідчать про таку ж позиційну і субстратну специфічність ферментів [14].

В останній час відповідно до високої гомології транскриптів більшості ліпоксигеназ, які показують високу схожість послідовностей (~ 70%), та наявності транзитного пептиду хлоропласта, позначають як ліпоксигенази 1-го типу. Деякі ліпоксигенази за наявності N-термінального транзитного пептиду з помірною загальною схожістю послідовностей (~ 40%) класифікують як 2-го типу ліпоксигенази – Тип1 9-ліпоксигеназа, Тип1 13-ліпоксигеназа, Тип2 13-ліпоксигеназа [17].

Крім рекомендованої назви ліпоксигеназ в літературі часто зустрічається різноманітні скорочення та найменування ліпоксигеназ, які належать до одного ж того класу. Так, наприклад, для ферментів КФ 1.13.11.33, арахідонат 15-ліпоксигеназа, можливо зустріти і такі назви як 15-ліпоксигеназа, 15(S)-ліпоксигеназа, ендотеліальна 15-ліпоксигеназа-1, епідермальна 15-ліпоксигеназа, лінолевої килоти омега-6-ліпоксигеназа, ретикулоцитарна 15-ліпоксигеназа-1, соєва 15-ліпоксигеназа, соєва ліпоксигеназа-3 і т.ін.

1.1.2. Структура ліпоксигеназ

Ліпоксигенази - мономерні білки з молекулярною вагою у клітинах людини та тварин - 75-80 кДа, у рослинних клітинах - 94-100 кДа. Амінокислотна послідовність молекули представлена близько 670 амінокислотними залишками з майже 90 % ідентичності між ферментами з тваринних об'єктів [24, 25]. Для соєвих ЛО-1 та ЛО-3, арахідонової 15-ліпоксигенази, 15-ліпоксигенази з кролячих ретикулоцитів отримано данні щодо кристалічної будови ферментів [15; 17].

До складу каталітичного С-кінцевого домену (залишки 121-673) рослинних ліпоксигеназ, вага якого близько 55-65 кДа [16], входить активний центр ферменту з одним атомом негемового заліза [25]. За даними рентгеноструктурних та спектроскопічних досліджень координаційна сфера заліза розташована у просторі у вигляді похилого октаедру, який формується трьома гістидиновими залишками, С-кінцевою карбоксильною групою і залишком аспарагіну (дані для соєвої ЛО-1 [16, 26, 27]). Два консервативних залишки гістидину та С-кінцевий ізолейцин утворюють тріадний якір для заліза, подібно до активного центру мономерних негемових залізовмісних ферментів [25]. За даними спектроскопічних досліджень за умови знаходження заліза у активній Fe^{3+} -формі за рахунок гідроксид-іону кількість лігандів зростає до шести. His-367 та Asn-554 можуть слугувати додатково як замінні ліганди до заліза [28]. Утворення С-кінцевий вузла внаслідок стабілізації водневим зв'язком (Asn-699 до His-399) одного з лігандів заліза - С-кінцевого залишку описано в роботі [25]. Ліпоксигенази потужніші окисні агенти, ніж інші негемові залізовмісні ферменти, оскільки відновлювальний потенціал заліза у активному центрі ферменту дорівнює 0,6 V [27].

Вісім ділянок β -складчастої структури іншого домену - N-кінцевого β -складчастого домену представлено 110-115 амінокислотними залишками (залишки 1-114) у ліпоксигеназ з тваринних об'єктів та 150 амінокислотними залишками у ліпоксигеназ з рослин (25-35 кДа [16]). Цей домен, можливо, залучений у регуляцію функціональної активності ліпоксигеназ шляхом забезпечення сорбції ферменту на мембранну поверхню, взаємодії з ліпідами та іонами кальцію [25, 29, 30].

1.1.3. Каталітичний механізм ліпоксигеназ

Каталітичний механізм ліпоксигеназ складається з стереоселективного відриву одного з двох атомів водню від прохирального метиленового атому вуглецю (C_n) пентадієнового зв'язку, введення гідроперекисної групи біля C_{n-2} атому відносно карбоксильної групи або біля C_{n+2} атому відповідно для ліпоксигеназ з картоплі і пшениці або ліпоксигенази з тромбоцитів та соєвої ЛЮ-1 [15, 17, 19]. Для ферментів C_{n+2} -типу позиція відриву протону визначається відстанню від метильної групи субстрату, а для C_{n-2} - відстанню від карбоксильної групи. Орієнтація субстрату в активному центрі ферменту відбувається шляхом заглиблення субстрату у каталітичну порожнину починаючи з метильної групи для C_{n+2} -ферментів, і, навпаки, з карбоксильної групи - для C_{n-2} -ферментів. При цьому позиційна специфічність ліпоксигеназ обумовлена глибиною занурювання субстрату у порожнину активного центру ферменту [31]. Змінити позиційну специфічність ліпоксигеназ, зокрема, з 5-ліпоксигенази на 15-ліпоксигеназу, вдається заміною амінокислотних залишків з невеликим вуглецевим ланцюгом на більш громіздкі амінокислоти. Отже, позиційна та стереоспецифічність ліпоксигеназ досить висока і обумовлена певним амінокислотним складом і, відповідно, просторовою конформацією молекули ферменту, що вдалося довести, досліджуючи специфічність білків - мутантів по окремим амінокислотним залишкам. В той же час, такі ферменти, як ретикулоцитарна ліпоксигеназа, що утворює суміш 15- та 12-гідропероксидів арахідонової кислоти [32] та картопляна 13/9-ліпоксигеназа, що утворює еквімолярну суміш 13- та 9-гідропероксидів з лінолевої кислоти [20] проявляють властивості до різного розташування гідроперекисної групи, демонструючи так звану подвійну позиційну специфічність по відношенню до субстрату реакції.

Специфічне введення гідроперекисної групи обумовлює утворення ізомерів: L-гідропероксиду - біля C_{n+2} атому вуглецю та D-гідропероксиду - біля C_{n-2} атому вуглецю. Стереоселективний відрив одного з двох атомів водню біля метиленового вуглецю пентадієнового зв'язку супроводжується стереоспецифічним введенням кисню з різних сторін площини подвійного зв'язку. Так, ферменти, здійснюючи відрив L-водню вводять кисень у D- конфігурації, і, навпаки, введення кисню в L-позицію відбувається за умови відщеплення D-водню. При утворенні гідропероксидів полієнових жирних кислот відбувається ізомеризація та кон'югація цис-,цис- положення подвійного зв'язку у цис-,транс-положення [15; 17; 19]. На рис.1.3. показано на прикладі окиснення лінолевої кислоти у присутності ліпоксигеназ закономірності позиційної та стереоспецифічності (за C_{n-2} та за C_{n+2} механізмами).

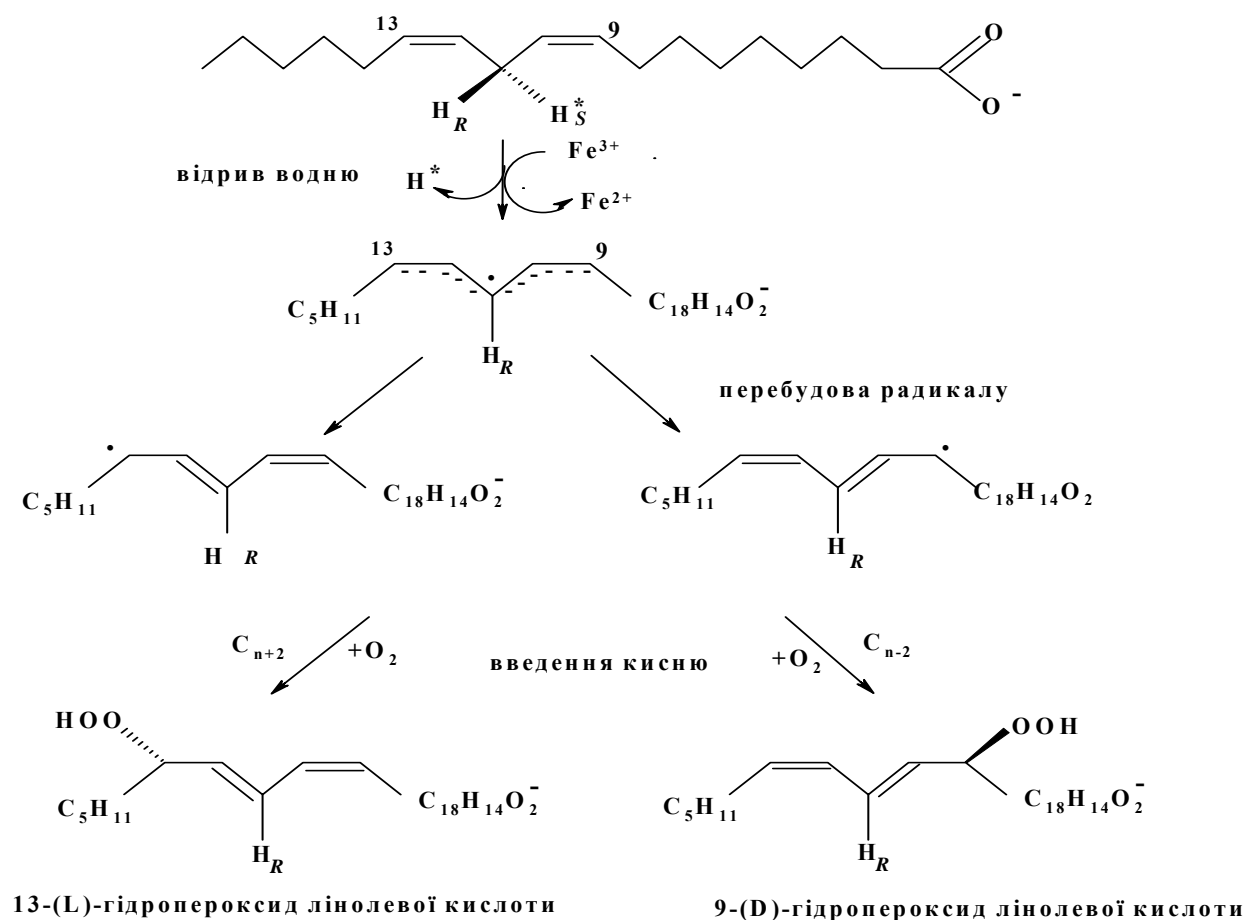


Рис. 1.3. Позиційна та стереоспецифічність ліпоксигеназ [15; 33].

Ізомерний склад продуктів реакцій ліпоксигеназного каталізу залежить від хімічної будови молекули субстрату. Показано, вплив етерифікації поліненасичених жирних кислот, зокрема, у випадку фосфоліпідів, на ізомерний склад продуктів ліпоксигеназного каталізу [34-39]. З порушеннями орієнтації субстрату у активному центрі картопляної ліпоксигенази при окисненні лінолевого спирту та 1-монолінолеїлгліцеролу пов'язують утворення суміші відповідних 9- та 13-гідропероксидів [40-43]. Досліджено 5-ліпоксигеназне окиснення лінолевого спирту в присутності 4-гідрокси-ТЕМПО, який ефективно блокує неферментативні вільно-радикальні реакції, але не впливає на функціональні групи ферменту та не конкурує з субстратом за активний центр ферменту. Результати кінетичних експериментів вказують на існування механізму реакції, при якому 4-гідрокси-ТЕМПО ефективно перехоплює радикали, що дисоціювали з активного центра 5-ліпоксигенази, змінюючи при цьому профіль продуктів загальної реакції [41]. Знайдені ефективні інгібітори окиснення лінолевого спирту, що каталізується 5-ліпоксигеназою, - стабільні нітроксильні радикали - 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидиніл-4-овий ефір 1-біцикло{2,2,2}октанової, адамантил-1-оцтової, додеканової і октадеканової кислот. Вивчено закономірності інгібуючої дії 2,2,6,6-тетраметил-піперидин-1-оксилу (ТЕМРО) та його 4-заміщених похідних - 4-аміно-ТЕМРО і 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпіперидинил-4-ових естерів адамантан-1-карбонової і 3-метиладамантан-1-карбонової кислот на активність 5-ліпоксигенази з бульб картоплі при окисненні лінолевої кислоти та лінолевого спирту. Виявлено, що надлишкові концентрації інгібітора повністю не пригнічують активність ферменту, а зменшують до певного рівня, який визначається природою субстрату. Передбачається, що механізм інгібування включає взаємодію

гідрофобного нітроксильного радикала з проміжним радикальним фермент-субстратним комплексом.

Еквімолярна суміш 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти утворюється і внаслідок окиснення субстрату у складі фосфатидилхолінових міцел, що каталізується соєвою 13-ліпоксигеназою [44]. Зміна фізико-хімічних факторів може також вплинути на позиційну та стереоспецифічність ліпоксигеназ. Так, за умов закиснення реакційного середовища, соєва 13-ліпоксигеназа здібна утворювати 9-гідропероксид лінолевої кислоти [45]. Зміни у позиційній специфічності ліпоксигеназ за певних умов можуть мати певний фізіологічний сенс для живого організму з огляду на спектр утворених за таких умов первинних ліпоксигеназних продуктів та продуктів інших ферментів ліпоксигеназного каскаду, які каталізують реакції конверсії гідропероксидів полієнових жирних [46] з певними фізіологічними властивостями.

1.2. Ліпоксигеназний шлях окиснення поліненасичених жирних кислот

Широке розповсюдження ліпоксигеназ, які присутні майже в усіх еукаріотичних організмах [1; 3; 47], обумовлено різноманіттям функцій ліпоксигеназних метаболітів в клітинах рослин і тварин.

Схематично на рис.1.4. представлені загальні функції ліпоксигеназ в живих організмах.

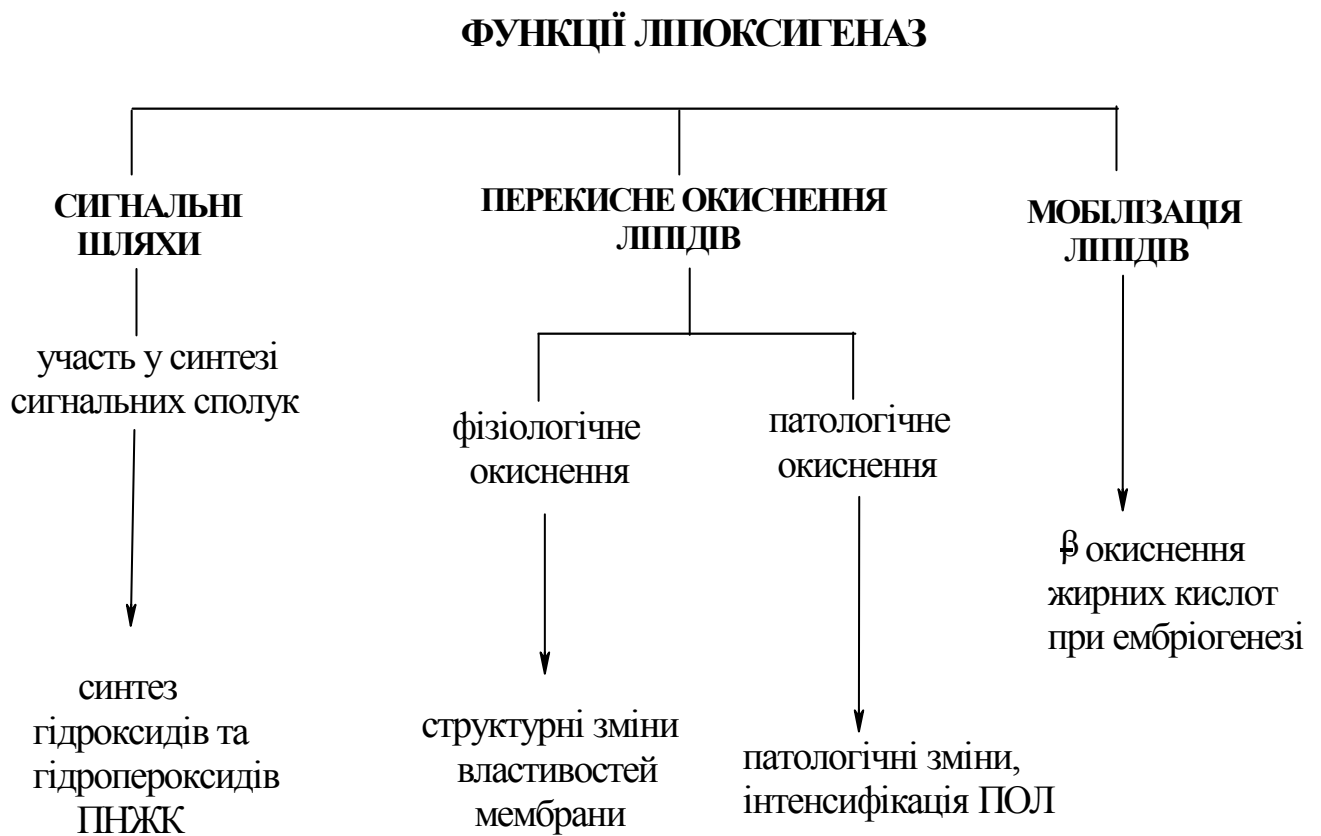


Рис. 1.4. Функції ліпоксигеназного каталізу в рослинних та тваринних організмах. [17].

У тварин та людини під дією ключових ферментів - 5-, 12-, та 15-ліпоксигеназ на арахідонову кислоту та за участю інших ферментів ліпоксигеназних каскадів утворюються лейкотрієни, ліпоксини, гепоксиліни [48, 49]. Ліпоксигеназні метаболіти провокують запальні та алергійні процеси завдяки вивільненню гістаміну та впливають на рух лейкоцитів [50, 51]. Такі патологічні стани як канцерогенез, ішемічна хвороба серця, алергічний риніт, інфаркт міокарду, псоріаз, атеросклероз, бронхіальна астма пов'язують з гіперпродукцією метаболітів ліпоксигеназ [51-53].

Субстрати рослинних ліпоксигеназ – лінолева, ліноленова кислоти, оксигенована ліноленова кислота, триацилгліцериди, фосфоліпіди – [1, 16, 41]. Загальна схема ліпоксигеназного каскаду рослин представлена на рис. 1.5 [54]. Продукти цих розгалужених ферментативних реакцій - оксиліпіни, забезпечують відповідь рослини на дію біотичних та абіотичних стресів, приймають участь у старінні клітин, апоптозі, в процесах росту та розвитку рослини [55, 56]. Під дією пероксигеназ гідропероксиди полієнових жирних кислот перетворюються на епоксипохідні ненасичених жирних кислот, попередники синтезу мономерів кутину – основного компоненту кутикули, що захищає наземні частини рослини [1]. Альдегіди та альдокислоти – продукти гідропероксидліаз, мають потужні бактерицидні та фунгіцидні властивості. Викид альдегідів в перші секунди після ушкодження рослини забезпечує захисний бар'єр на шляху патогених організмів. Альдокислотам, зокрема, 2-цис-додецен-1,12,-дикарбоновій кислоті (травматинівій), 12-оксо-10-транс-додеценівій кислоті (травматину) та 12-гідрокси-9-цис-додеценівій кислоті притаманні властивості спричинювати загоювальну дію, стимулюючи поділ клітин та утворення калусу у місцях ушкодження [1, 3, 47]. Фунгіцидна дія при ураженні картоплі *Phytophthora infestance* показана для продуктів

дівінілестерсинтази – дівінілових естерів ПНЖК, колнелевої та колнеленової кислот [57, 58].

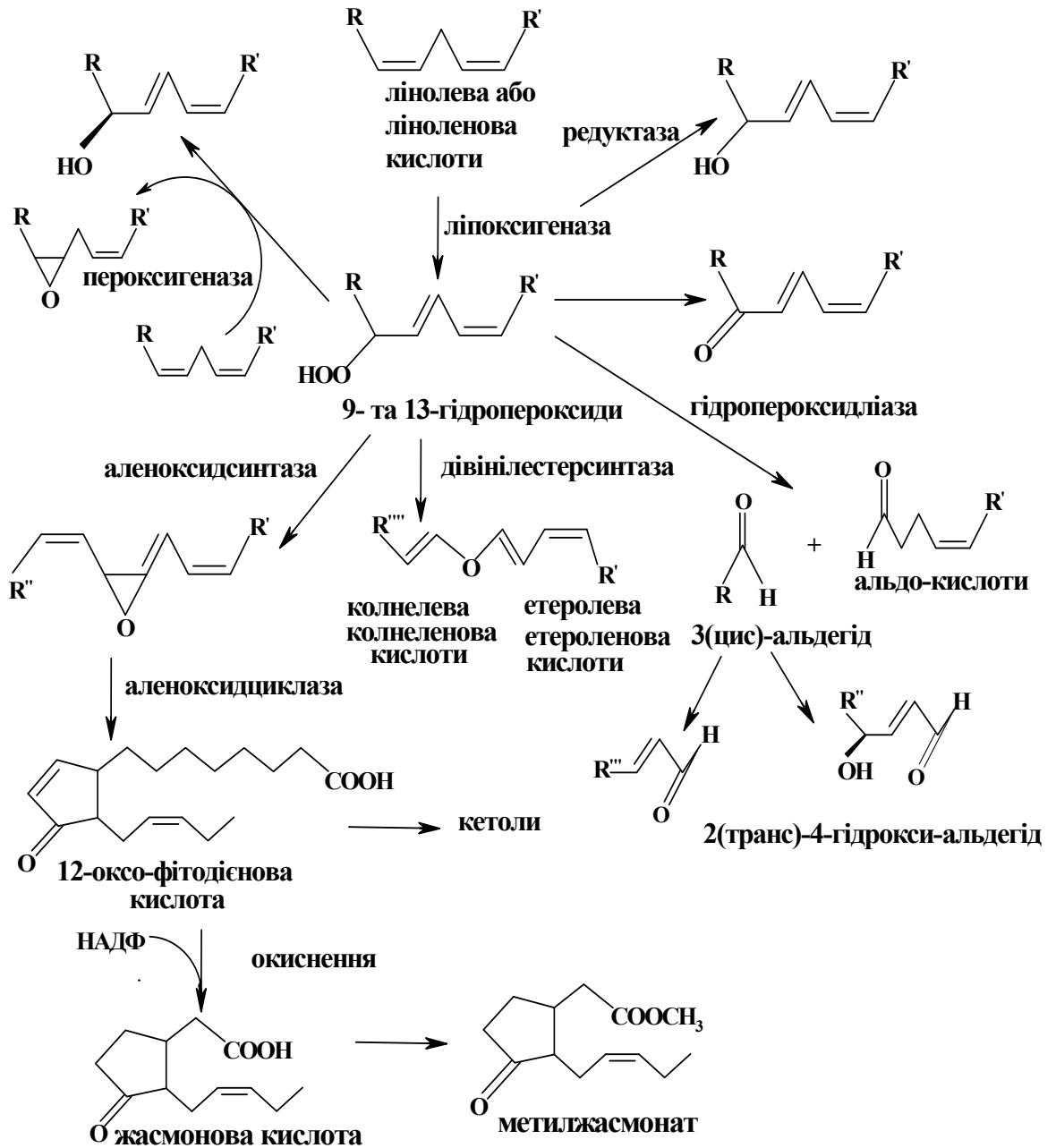


Рис. 1.5. Ліпоксигеназний каскад поліненасичених жирних кислот в рослинах.

За послідовної дії аленоксидсинтази та аленоксидциклази на 13-гідропероксиліноленову кислоту утворюється 12-оксо-10,15-цис-

фітодієнова кислота, попередник жасмонової кислоти та її похідних (жасмонатів) [59], що забезпечують пристосування рослинного організму до впливу несприятливих факторів - біотичних (ушкодження патогенними організмами та комахами) та абіотичних (механічне ушкодження, підвищена концентрація солі, висока та низька температура) [55], як безпосередньою дією на активність певних ферментів, так і опосередковано, через індукцію експресії певних генів [57, 60, 61].

1.3. Участь ліпоксигеназ в адаптації рослинної клітини до абіотичних та біотичних стресів

За визначенням Сел'є, стрес – це сукупність усіх неспецифічних змін, що відбуваються в організмі за умов впливу на нього окремих чинників. До компонентів неспецифічної відповіді на стрес відносять зміни у білок-синтезуючій системі, фітогормональному балансі, активності ферментів [62].

Є дані про підвищення під впливом рослинних гормонів - абсцизової кислоти, цитокінінів, брассиностероїдів, саліцилової кислоти стійкості рослин [63-67], але механізми захисної дії цих сполук недостатньо з'ясовані. З іншого боку, відомо, що в рослинних тканинах в процесі росту та розвитку змінюється активність ліпоксигеназ та їх ізоферментний склад [68-70].

Інтенсифікація ліпоксигеназного метаболізму може здійснюватись не лише за рахунок активації присутніх в клітині ферментів, але і завдяки індукції експресії генів. Так спостерігається підвищення рівня мРНК, що кодують різні форми ліпоксигеназ, під впливом механічного ушкодження рослин [71-74], осмотичного шоку [75-78], підвищення температури [79], дії патогенів [80, 81], жасмонової кислоти [80], метилжасмонату [82, 83] і т.ін. Стрес або сигнал можуть викликати неоднакову інтенсивність та залежне від часу накопичення транскриптів різних форм ліпоксигеназ [5, 17, 70, 72, 84]. Механічне ушкодження, патогени, елісители індукують в клітинах рослин вивільнення із мембранних ліпідів ненасичених лінолевої та ліноленової кислот. Подальші перетворення цих кислот ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення окиснених похідних поліненасичених жирних кислот, в тому числі фізіологічно активних сполук, що

виконують роль стимуляторів росту, бактерицидів та фунгіцидів, які індуюють захисні реакції [85-87].

Важливу роль в ліпоксигеназному метаболізмі відіграють гідропероксидліази вищих рослин. Гідропероксидліази – ферменти каскаду поліненасичених жирних кислот, що каталізують реакції перетворення первинних продуктів ліпоксигеназних реакцій - 9-гідропероксилінолевої та 9-гідропероксиліноленової кислот у C₉-альдегіди та C₉-альдокислоти, а також 13-гідропероксилінолевої та 13-гідропероксиліноленової кислот в C₆-альдегіди та C₁₂-альдокислоти. Відомостей про фізіологічну дію C-9 сполук та подальші їх перетворення майже немає, в той час як C-6 та C-12 сполуки в достатній мірі вивчені [88, 89]. Показано, що оксиліпіни – травматин та травматинова кислота індуюють ділення клітин в місцях ушкоджень, 12-гідрокси-9(Z)-додеценова кислота є ефективним стимулятором росту [90, 91]. Є відомості про гідропероксидліазну активність знайдену у бульбах картоплі [92], але механізм дії та регуляції активності цього ферменту на даний час невідомий. З іншого боку, продукти гідропероксидліазного шляху швидко накопичуються при ушкодженні та можуть діяти як сигнальні молекули в захисних реакціях рослинної клітини. Так, в *A.thaliana*, (E)-2-гексеналь індукує появу жасмоновою кислотою індукованих генів, що обумовлюють захисні реакції клітини, але не індукує деякі інші жасмонат-залежні гени [72]. Це є свідченням, що похідні інших ліпоксигеназних шляхів, ніж шлях утворення жасмонової кислоти, теж можуть бути медіаторами реакції на зовнішнє подразнення (ушкодження та ін.).

На даний час безсумнівною є участь ліпоксигеназ в процесах росту та розвитку, стійкості до стресів рослин, але молекулярні механізми цих процесів остаточно не з'ясовані. Ключовий фермент біосинтезу жасмонової кислоти - 13-ліпоксигеназа, її активність визначає

внутріклітинний рівень жасмонової кислоти та контроль процесів, що індукуються цим фітогормоном. Інший фермент рослин - 9-ліпоксигеназа перетворює ліноленову кислоту на інші сполуки, роль яких практично невідома.

Вірогідно формування відповіді рослини на дію певного стресу є багатограним та складним процесом, що залежить від багатьох факторів [67]. Для рослин показано взаємодію оксиліпінів ліпоксигеназного походження з сигнальними каскадами інших біологічно активних сполук, зокрема фітогормонів.

Фітогормон - *жасмонова кислота* та її метиловий ефір – метилжасмонат забезпечують відповідь рослини на дію абіотичних або біотичних стресорів [93] - патогенів, механічне ушкодження та ін. [85, 94, 95]. Продемонстровано вплив жасмонової кислоти на експресію генів, таких як FAD7 (десатурази ω -3 жирних кислот, [96]), LOX1 (ліпоксигенази 1, [97]), LOX2 (ліпоксигенази 2, [71]) та AOS (алленоксидсинтази, [98]). Ключовим ферментом біосинтезу цього фітогормону є 13-ліпоксигеназа, що каталізує реакцію окиснення α -ліноленової кислоти до 13-гідропероксиду ліноленової кислоти. В подальший каскад ферментативних реакцій включається 12-оксо-фітодієнової кислоти редуктаза (OPR). Показано вплив жасмонової кислоти на утворення бульб картоплі [99]. Знайдено, що в листі картоплі присутні 13-ліпоксигенази - lox2 та lox3 (в хлоропластах), основними продуктами яких є 13-гідропероксили ліноленової кислоти - попередники жасмонової кислоти. В той же час, в бульбах та корінні картоплі виявляють ліпоксигеназу - lox1 (цитоплазматичний фермент), основний продукт якої - 9-гідропероксид лінолевої кислоти або ліноленової кислот. На даний час фізіологічне значення певної компартменталізації ізоформ ліпоксигеназ не з'ясоване. Відомо лише, що ферменти, які перетворюють гідропероксили жирних кислот на

жасмонову кислоту, зазвичай, локалізовані в оболонці хлоропластів [100]. Відомо, що за умови ушкодження поверхні листа, рівень транскрипції 13-ліпоксигеназ - lox2 та lox3 підвищується порівняно з вихідним. Так, пік мРНК lox3 з'являвся раніше ніж через 30 хв після ушкодження, а lox2 постійно підвищувався протягом 24 год, що свідчить про певну роль ізоформ ліпоксигеназ в синтезі рослинного гормону – жасмонової кислоти. З іншого боку, обробка листя жасмоновою кислотою призводила до постійного високого рівня транскрипції lox2 та lox3. Обробка рослини сполукою, відомою як інгібітор ліпоксигеназної активності, - саліцилгідроксамовою кислотою - блокувала експресію ліпоксигеназ та захисних генів [101]. Цікавим є те, що ефект інгібітору можна було нівелювати додаванням жасмонової кислоти. Показано також значне підвищення рівня жасмонової кислоти при старінні рослини [89]. Передбачається, що жасмонова кислота бере участь в реалізації програми старіння рослинної клітини. Ідентифікація в *A. thaliana* двох різних ліпоксигеназних гена – AtLox1 та AtLox2 [102], [97] та досліді на трансгенних рослинах підтвердили існування двох шляхів синтезу жасмонової кислоти [71]. Так, було встановлено, що AtLox2, присутня в хлоропластах, приймає участь в індукваному ушкодженням синтезі жасмонової кислоти. Підвищення рівня транскрипції гену AtLox2 відбувалось через дві години після обробки листя жасмоновою кислотою та було максимальним через 24 години. В той же час AtLox1, що локалізована в цитоплазмі, не приймала участі в синтезі жасмонової кислоти.

Інший рослинний гормон – *абсцизова кислота* (АБК) забезпечує стійкість рослини до ушкодження, ймовірно, шляхом активації біосинтезу жасмонової кислоти [103]. Але, було встановлено [99], що при обробці листя АБК накопичення lox2 та lox3 практично не відбувається, але має місце індукція АБК- чуттєвого інгібітору

протеїназ. На даний час роль фітогормону АБК в регуляції ліпоксигеназної активності в рослинах є не ясною. Є лише окремі дані про вплив АБК на ліпоксигенази. Так зміну активності та експресію генів ліпоксигеназ сої досліджено на рівні транскрипції та трансляції [76]. Встановлено, що АБК не тільки не підвищувала експресію ліпоксигеназних генів, але, навіть, зменшувала активність LOX2 та не впливала на LOX1. В той же час в умовах осмотичного стресу відбувалось підвищення рівня відповідних мРНК, вмісту білку та специфічної активності ферментів. Обробка саліциловою кислотою за дії підвищеної температури підвищувала термостійкість листя [79]. Обидва фактори викликали підвищення вмісту АБК та зменшення активності ліпоксигеназ. Передбачається, що АБК та саліцилова кислота приймають участь у захисту *Vitis vinifera L.* від негативної дії температури, індукуючи термостійкість рослини. АБК може грати важливу роль в розвитку рослин та захисті їх від стресу [104], здійснюючи як активуючу, так і інактивуючу дію на експресію генів.

Дослідження *брасиностероїдів* (БС) [105] та їх наступне вивчення надало нове бачення гормональних функцій стероїдів в живих організмах, в тому числі як рослинних гормонів. При екзогенному застосуванні на овочевих рослинах вони здатні стимулювати ріст рослин та їх розвиток. Саме можливе застосування в сільському господарстві (с/г) і є причиною початку досліджень брасиностероїдів. За два останні десятиріччя було ідентифіковано та синтезовано серію БС різної структури, які зустрічаються у природі, досліджено їх фізіологічні властивості та було вирішено багато питань, пов'язаних з комерційним виробництвом, та офіційним статусом брасиностероїдів як нових с/г хімічних засобів. З часу відкриття брасиностероїдів, з'явилося більше тисячі статей, що стосуються різних аспектів дослідження брасиностероїдів, які в основному підсумовані в монографіях ([106],

[107]) та оглядах ([66, 108-115]). Встановлено, що похідні брассиностероїдів позитивно регулюють експресію декількох генів, функції яких пов'язані з збільшенням клітини та організації клітинної стінки [116], впливають на осморегуляцію клітин рослин [117], відновлюють організацію мікротрубочок та елонгацію клітин брассиностероїд-дефіцитних мутантів [118], впливають на проліферацію клітин [119], однак результати досліджень на клітинних культурах та рослинах, є суперечливими внаслідок використання в дослідах цілої комбінації гормонів [120]. Показано вплив брассиностероїдів на розростання листка [121, 122]. Загалом визначення ролі брассиностероїдів у процесах регуляції клітинного поділу є далекими від остаточного з'ясування. Останні молекулярно-генетичні дослідження мутантів з дефіцитом брассиностероїдів та мутантів, не чутливих до брассиностероїдів, встановили необхідну роль брассиностероїдів у процесах росту та розвитку і сприяли ідентифікації декількох компонентів сигнального каскаду брассиностероїдів [123-127]. Гени, що включені в клітинний поділ, диференціацію судин, взаємодію фітогормонів також були визначені як регуляторні гени брассиностероїдів [128, 129]. Існує зв'язок між дією брассиностероїдів та підвищенням стійкості до різноманітних стресових умов навколишнього середовища, але механізми, які пов'язують сприймання брассиностероїдів та названі фізіологічні реакції, невідомі. Дослідження молекулярних основ теплового шоку лише тільки розпочалося. Показано, що дія брассиностероїдів достовірно підвищує термотолерантність [130, 131]. Оброблені брассиностероїдами паростки *V. Napus* мали підвищений рівень синтезу та накопичення білків теплового шоку. Показано також підвищення стійкості БС-оброблених рослин до температури, солі, води, фітопатогенів та інших стресових факторів [66, 132, 133].

Вважається, що brassиностероїди позитивно впливають на рівень експресії мРНК OPR3 та ген OPR3 забезпечує потенціальний зв'язок між дією brassиностероїдів та жасмонової кислоти. Показано, що brassиностероїди можуть стимулювати експресію стрес-залежних генів таких як OPR3, LOX2 та інших, що мають відношення до біосинтезу жасмонової кислоти [134, 135]. Але на даний час лишається незрозумілою функція brassиностероїдів в ЖК-опосередкованому сигналі [116, 129, 136].

Є дані про залучення ліпоксигеназної сигнальної системи в БС-індуковану відповідь клітини [6, 137]. Повідомляється про залучення ліпоксигеназної системи у відповідь клітин, індукованих brassиностероїдами, які так само викликають зростання продуктів 9-ліпоксигеназ [137]. Таким чином, крім основної ролі в рості рослин та розвитку, brassиностероїди захищають рослину від різноманітних зовнішніх стресів, в тому числі стресів, викликаних високою та низькою температурою, засухою, підвищеною солоністю, ушкодженням рослини. Але досліджень, які підтверджують здатність brassиностероїдів модулювати відповідь рослин на стрес, а також відомостей про молекулярні механізми цих процесів на даний час недостатньо.

Ріст рослин за допомогою подовження та поділу клітин вимагає координації кількох процесів, на функціонування деяких з них вочевидь впливають brassиностероїди. Пластичність клітинної стінки збільшується при екструзії протонів за участю H⁺-АТФаз, що зумовлює підкислення середовища апопласту, що в свою чергу активує ферменти, які розм'якшують клітинну стінку. Надалі тургорний тиск зумовлює розширення клітини в той час коли матеріали нової клітинної стінки та мембрани синтезуються та декретуються в клітині. Наразі лише у деяких дослідженнях демонструвалось, що дія brassиностероїдів зумовлювала зростання АТФазної активності у епикотілях гороху та коренях

кукурудзи, що призводило до екструзії протонів [138], а дія 24-епібрассинолідів зумовлювала підвищену релаксацію клітинної стінки [139, 140]. Брассиностероїди позитивно регулюють експресію генів, функції яких пов'язані з збільшенням клітини та організації клітинної стінки [116]. Брассиностероїди впливають на форму та розмір клітини шляхом регуляції динаміки мікротрубочок [141, 142]. Припускають, що брассиностероїди впливають на проліферацію клітин, хоча результати досліджень, в яких використовувалися різноманітні клітинні культури та види рослин, є суперечливими [120, 121, 143].

В реалізації молекулярних механізмів дії фітогормонів приймають участь фосфоліпази, продукти дії яких є субстратами ліпоксигеназ (ПНЖК) або регуляторами активності (фосфатидна кислота). Так, відомо, що фосфоліпази D (ФЛД) приймають участь в індукованій ушкодженню акумуляції ненасичених жирних кислот та жасмонової кислоти [144, 145], а також за умов водного дефіциту у рослин [146]. Вільні жирні кислоти, зокрема, олеат, підсилюють захисні реакції клітини при патогенному впливі [147] та ушкодженні [148]. Підвищений вміст вільних жирних кислот є ознакою старіння листя [149]. Олеат-залежна ФЛД відіграє роль в розвитку та старінні листя, а також в акумуляції фосфатидної кислоти при адаптації клітини до водного дефіциту [150].

Як і більшість білків еукаріотичної клітини, ферменти каскаду ПНЖК, можливо знаходяться в тісному контакті як один з одним, так і з мембраною, цитоскелетом та іншими клітинними структурами. В адсорбованому на субклітинних структурах стані ферменти повинні мати певні каталітичні властивості, чутливість до алостеричних ефекторів та ін. За літературними даними та у відповідності з результатами наших власних досліджень ферменти каскаду ПНЖК (зокрема, ліпоксигенази та гідропроксидліази) відносяться саме до того

типу ферментів, що каталізують реакції, які відбуваються у мембрані або примембраному шарі рідини. Стадія адсорбції фермента на біомембрану є першим етапом у регуляції його активності. Отримані докази існування сполук білкової – FLAP [151] та ліпідної - фосфатидова кислота, фосфатидилінозит [152-156] природи, що стимулюють ліпоксигенази рослин і тварин. Фермент може емігрувати з цитозолу на мембрану, яка містить FLAP або кислий фосфоліпід (т.з. “докінг ферменту”). В реалізації молекулярних механізмів фітогормонів приймають участь фосфоліпази, продукти дії яких є субстратами ліпоксигеназ (полієнові жирні кислоти) або регуляторами активності (фосфатидна кислота). В тваринних та рослинних організмах знайдені мембранозв’язані фосфоліпази D (ФЛД), що активуються олеїновою кислотою [157-159] - олеат-залежні ФЛД. В рослинах підвищений рівень експресії асоційованої з плазматичною мембраною та олеат-залежної ФЛД спостерігається в старому листі, стеблі, квітах, коренях порівняно з молодим листям та проростками [157]. Активуючий вплив на фермент мають ліолева та ліноленова кислота, але вони менш ефективні, ніж олеїнова. В той же час стеаринова та пальмітинова кислоти взагалі не впливають на активність олеат-залежної ФЛД.

Результатом ферментативної діоксигенації ліолевої, ліноленової, та γ -ліноленової кислот в рослинах є відповідні 9- та 13-гідропероксиди, що залучаються до наступних ферментативних перетворень, в результаті яких утворюється низка біологічно-активних речовин під загальною назвою – *оксиліпіни* [5, 15, 160]. Одним з основних напрямків дії даних сполук є формування відповіді рослини на дію несприятливих факторів або ушкоджень. Більшість досліджень присвячена регуляторній ролі оксиліпінів за дії біотичних (дія еліситорів, ушкодження комахами, механічне ушкодження) стресів [5, 15, 91]. Низка продуктів ліпоксигеназного ферментативного каскаду має потужні бактерицидні та

фунгіцидні властивості, що забезпечує бар'єр на шляху патогенних організмів. Важливу роль у системі захисту рослин від ушкодження має синтез С₆-гексеналів. Викид цих летючих сполук відбувається вже через 10 секунд після ушкодження рослини [91]. У рослинах більшість гідроперокси- та гідроксипохідних, епокси- та епоксигідроксипохідних лінолевої та ліноленової кислот проявляють антимікробну властивість. Гексеналі мають антигрибкову та антимікробну властивість, забезпечуючи первинний хімічний захист рослин від патогенів [1]. Альдокислоти, зокрема 2-цис-додецен-1,12,-дикарбонова (травматинова), та 12-гідрокси-9-цис-додеценова кислоти проявляють потужну загоювальну дію, шляхом індукції поділу клітин та утворення калюсу у місцях ушкодження рослини. Одним з кінцевих продуктів ліпоксигеназного каскаду є жасмонова кислота та її похідні (жасмонати) [91]. Дія жасмонатів забезпечує адаптацію рослинного організму до стресів як безпосереднім впливом на активність певних ферментів, так і опосередкованою дією, яка реалізується шляхом індукції експресії генів. До жасмонатіндукованих протеїнів відносяться інгібітори протеїназ 1, 2 та трипсину, вегетативні запасні білки, стресові білки, фенілаланін-амоній-ліаза, халконсинтаза, ліпоксигеназа, поліфенолоксидаза та ін. Це дозволяє розглядати ліпоксигеназний каскад, як окрему сигнальну систему [91].

Роль ліпоксигеназної сигнальної системи у формуванні адаптації рослини до дії абіотичних стресів досліджено недостатньо. Відомо про залучення ліпоксигеназ до інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів в умовах сольового стресу у клітинах *Citrus sinensis* L. [161]. Збільшення вмісту малондіальдегіду в умовах осмотичного стресу у *Brassica napus* L. корелювали із збільшенням активності ЛО [162]. Також, збільшення активності ліпоксигеназ встановлено у *Olea europaea* L. за дії посухи при інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів у коренях рослини [163]. З

іншого боку ріст ліпоксигеназної активності в умовах сольового стресу спостерігається лише у стійких до підвищеної концентрації солі культур клітин [161]. Переважною локалізацією певної ізоформи ліпоксигеназ обумовлено зміни в активності ферменту - ріст активності ЛО частіше відбувається у листі рослини та рідше - у коренях [164, 165]. Є окремі дані про вплив АБК на ліпоксигенази та на даний час роль фітогормону АБК у регуляції ліпоксигеназної активності у рослинах остаточно не ясна. Їх взаємозв'язок дії гормону сольового стресу - АБК та прояв активності ліпоксигеназ встановлено за дії механічного ушкодження - дія АБК на фермент є стимулюючою [103] на відміну від інгібування функціонування ліпоксигеназного шляху синтезу оксиліпінів при обробці рослин АБК за нормальних умов [99]. В той же час, ліпоксигеназний метаболіт - 9-гідроктадекатрієнова кислота здібна перехресно впливати на появу латеральних корінців за дії абсцизової кислоти та ауксину. До 30 % генів, які регулюються цією сполукою, індуються абсцизовою кислотою (АБК), а ауксином - 5 % [4]. АБК може по-різному впливати на експресію генів: дія цього гормону може бути як активуючою, так і інактивуючою [104], АБК може стимулювати біосинтез жасмонової кислоти [103], можливо активуючи ліпоксигеназну систему [166], при цьому активуючий ефект даної сполуки більше виражений у випадку 9- ліпоксигеназ, ніж 13-ліпоксигеназ з проростків кукурудзи [167], може взагалі не викликати накопичення $l\alpha x2$ та $l\alpha x3$ та одночасно індукувати АБК - чуттєвий інгібітор протеїназ [99], може на рівні транскрипції та трансляції ЛО не тільки не підвищувати експресію ліпоксигеназних генів, але і зменшувати активність LOX2 не впливаючи на LOX1 [76]. Однак, є дані щодо кореляції зростання концентрацій АБК та транскриптів ліпоксигеназ при водному дефіциті [168]. З іншого боку, підвищена температура та обробка саліциловою кислотою сприяють підвищенню

вмісту АБК та зменшенню активності ліпоксигеназ [79]. Існують відомості про антагоністичний вплив АБК та ліпоксигеназ – обробка АБК в умовах високотемпературного стресу знижувала синтез дитерпеноїду, а застосування інгібітору ліпоксигеназ викликало такий же ефект [169]. Продемонстровано також одночасне зростання активності ліпоксигеназ та кількості рослинних гормонів - АБК і жасмонової кислоти при механічному ушкодженні [170].

Встановлення функціональних зв'язків окремих компонентів апарату ліпідного обміну (ферментів – фосфоліпаз, ліпоксигеназ, гідропероксидліаз та їх метаболітів), а також ролі ліпоксигеназ в реалізації молекулярних механізмів дії фітогормонів дозволило б розширити існуючі уявлення про біологічне значення компартменталізації процесів перетворення ліпідів в живій клітині та її можливого регуляторного значення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. МАТЕРІАЛИ

В роботі були використані такі реактиви та матеріали: лінолева кислота, арахідонова кислота, лінолевий спирт, Lubrol PX, Brij-99, ліпоксигеназа з сої, лізофосфоліпіди («Sigma», США); етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) («Reanal», Угорщина), C18-картриджі (B&J, Inc.), ДЕАЕ-Toyoparl, Butyl-Toyoparl («Toyo-Soda», Японія), бичачий альбумін з сироватки крові («Pierce», США). Решта реактивів виробництва країн СНД мали кваліфікацію «Х.Ч.» або «ОС.Ч.». Як біологічний об'єкт використано проростки гібрида кукурудзи Говерла МВ, бульби картоплі сорту «Луговська». Брассиностероїди та їх похідні було синтезовано в Лабораторії хімії стероїдів Інституту біоорганічної хімії НАН Білорусі.

2.2. МЕТОДИ

2.2.1. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини за дії 24-епібрассинолідів та низьких температур.

Зерна кукурудзи пророщували протягом 5 діб в термостаті при температурі 25 °С у темряві в присутності або у відсутності 0,01 та 1 мкМ 24-епібрассинолідів. Частину 5-денних проростків витримували протягом 24 годин при 5°С (умови низькотемпературного стресу), а іншу частину рослин залишали на цей час при 25 °С (контрольні проростки), після чого з них скальпелем ізолювали мезокотиль [171].

2.2.2. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини за дії хлористого натрію та абсцизової кислоти.

Зерна кукурудзи пророщували протягом 5 діб в термостаті при температурі 26 ± 2 °C без освітлення [171]. На добу проростки переносили на 0,2 М розчин хлориду натрію (сольовий стрес), а контрольні рослини вирощували на дистильованій воді. Проросток препарували, скальпелем відділяли мезокотиль. В іншій серії експериментів частини 5-денних проростків витримували протягом 0,33-8 годин у розчині 10 мкМ АБК.

2.2.3. Отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні.

Для отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні, з бульб картоплі нарізали диски розміром 19 мм x 0,3 мм, інкубували при 25 °C протягом 0,5; 2 та 4 години в 0,05 М натрій-фосфатному буфері (рН 7,0) [172]. Потім диски відмивали охолодженою дистильованою водою.

2.2.4. Виділення ліпоксигеназ з проростків кукурудзи.

Ліпоксигенази виділяли з тканини мезокотилію [171], яку гомогенізували у п'яти об'ємах 0,1 М натрій-ацетатного буферу (рН 4,5), що містив 0,1 % Brij- 99, 0,1 мМ ЕДТА і 2 мМ метабісульфіт натрію. Після 30-хвилинної екстракції при перемішуванні, гомогенат центрифугували 45 хв при 5000 об/хв на центрифугі РС-6 (Росія). Всі

процедури проводили при 4 °С. Одержаний супернатант використовували для визначення активності ліпоксигеназ. Концентрацію білку визначали за методом Бредфорд [173].

2.2.5. Визначення активності ліпоксигеназ кукурудзи.

Реакційна суміш для визначення активності 9-ліпоксигенази в супернатанті містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,0), 0,02 % Lubrol PX; 0,1 мМ лінолеву кислоту, а для визначення активності 13- ліпоксигенази - 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0) і 0,02 мМ лінолеву або арахідонову кислоту [164, 171, 174]. Реакцію ініціювали внесенням у реакційну суміш 1-2 мкг ферменту. Визначення активності ферментів 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 $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [175]. 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). Вимірювання проводили в термостатованій комірці при 25 °С в триразовій повторності.

Для побудови рН-залежностей стаціонарних швидкостей реакцій окиснення лінолевої кислоти, що каталізуються 9- та 13-ліпоксигеназами, використовували буферні розчини: 0,1 М натрій-ацетатний (рН 4-5); 0,1 М МЕС-NaOH (рН 5-6,5); 0,1 М натрій-фосфатний (рН 6-8); 0,1 М натрій-боратний (рН 8-9).

2.2.6. Вивчення впливу фосфатидної кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи.

Визначення активності ліпоксигеназ кукурудзи проводили відповідно до 2.2.5. Фосфатидну кислоту розчиняли в 0,02 % Lubrol PX або в буферному розчині та додавали в реакційну суміш. Розрахунок залишкової активності ферменту проводили по відношенню до активності без ефектора в реакційній суміші (в %).

2.2.7. Визначення впливу brassinosteroidів та їх похідних на 9-ліпоксигеназу з бульб картоплі *in vitro*.

Ліпоксигеназу з бульб картоплі було отримано за схемою, яка складалась з екстракції, висолювання 25-50 % сульфатом амонію, діалізу, іонообмінної хроматографії на DEAE-Toyopearl (pH 7,5) та гідрофобної хроматографії на Butyl-Sepharose (pH 7,5) [156]. Активність ферменту визначали спектрофотометрично (спектрофотометр Specord M-40, «Carl Zeiss», Німеччина), реєструючи збільшення з часом оптичної густини реакційної суміші при $\lambda=235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Стандартна реакційна суміш містила: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (pH 6,3), 0,02 % Lubrol PX, 0,1 мМ лінолеву кислоту. Концентрацію білку визначали за методом Бредфорд [173]. Калібровочну криву будували, використовуючи стандартний розчин бичачого альбуміну з сироватки крові (концентрація 2 мг/мл). Реакцію ініціювали 2,5 мкг ферментного препарату. Вимірювання проводили в

термостатованій комірці при температурі 25 °С. Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції (V_{st}), яку представляли як середнє арифметичне трьох вимірів з відхиленням не більше 5%. Стаціонарну швидкість реакції (V_{st}) визначали в одиницях оптичного поглинання за хвилину (опт.од.₂₃₅/хв) або у мкМ окисненого субстрату за хвилину (мкМ/хв).

Брассиностероїди та їх похідні розчиняли в диметилсульфоксиді та додавали в реакційну суміш. Розрахунок залишкової активності ферментів проводили по відношенню до активності без ефектора у присутності диметилсульфоксиду (в %).

2.2.8. Вивчення впливу лізофосфоліпідів на активність 9-ліпоксигенази з бульб картоплі.

Активність ферменту визначали спектрофотометрично (спектрофотометр Specord M-40, «Carl Zeiss», Німеччина), реєструючи збільшення з часом оптичної густини реакційної суміші при $\lambda=235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Стандартна реакційна суміш містила: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3), 0,02 % Lubrol PX, 0,1 мМ лінолеву кислоту. Реакцію ініціювали 2,5 мкг препарату 9-ліпоксигенази. Лізофосфоліпідів розчиняли в 1 % Lubrol PX та додавали в реакційну суміш до кінцевої концентрації 0-160 мкМ лізофосфоліпідів та 0,02 % Lubrol PX. Вимірювання проводили в термостатованій комірці при температурі 25 °С. Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції (V_{st}), яку представляли як середнє арифметичне трьох вимірів з відхиленням не більше 5%. Стаціонарну швидкість реакції (V_{st}) визначали в одиницях оптичного поглинання за

хвилину (опт.од.₂₃₅/хв) або у мкМ окисненого субстрату за хвилину (мкМ/хв).

2.2.9. Ферментативний синтез 9-гідропероксиду лінолевої кислоти та лінолевого спирту.

Ферментативний синтез 9-гідропероксиду лінолевої кислоти або лінолевого спирту проводили з використанням розчину 9-ліпоксигенази з бульб картоплі з наступною очисткою на C18-мікроколониці (Burdick&Jackson октадецил (C18) картридж) [42, 176]. Реакційна суміш складалась з 0,1 М натрій - фосфатного буферу з рН 7,5; $0,16 \times 10^{-3}$ М лінолевої кислоти або лінолевого спирту. Реакцію починали, додаючи у суміш 90 мг частково очищеного препарату 9-ліпоксигенази з бульб картоплі. За перебігом реакції спостерігали по збільшенню поглинання при $\lambda = 234$ нм на Specord M-40 . Час перебігу реакції складав 10 хв. Реакцію зупиняли, додаючи до реакційної суміші лимону кислоту до рН 4,0. Потім суміш пропускали через Burdick&Jackson октадецил (C18) картридж. Продукт реакції – 9-гідропероксид лінолевої кислоти або 9-гідропероксид лінолевого спирту зв'язувався з гідрофобним носієм. Картридж з сорбованим на ньому 9-гідропероксидом лінолевої кислоти або лінолевого спирту промивали охолодженою водою. Продукт елюювали охолодженим метанолом, аналізуючи спектрофотометрично при $\lambda = 234$ нм ($\epsilon_m = 23000$ (моль/дм³)⁻¹*см⁻¹) кількість гідропероксидів у кожній із фракцій. Вихід 9-гідропероксиду лінолевої кислоти склав 83 %. Контроль чистоти отриманих гідропероксидів (вище 95 %) проводили методом обернено фазової високоефективної рідинної хроматографії на колонці LiChrosorb RP-18 (Merk) з використанням рефрактометричного детектору, та рухомої фази – метанол : вода = 9 : 1 (0,1 % H₃PO₄, v/v). Чистота

препарату склала 98%. Препарат зберігали при температурі мінус 40 °С під аргоном.

2.2.10. Ферментативний синтез 13-гідропероксиду лінолевої кислоти.

Ферментативний синтез 13-гідропероксиду лінолевої кислоти проводили з використанням розчину 13-ліпоксигенази із сої [42, 176]. Реакційна суміш складалась з 0,1 М натрій - боратного буферу з рН 9,5; $0,16 \times 10^{-3}$ М лінолевої кислоти. Реакцію починали, добавляючи у суміш 3 мг ліпоксигенази. За перебігом реакції спостерігали по збільшенню поглинання при $\lambda = 234$ нм на Specord M-40. Час перебігу реакції складав 10 хв. Реакцію зупиняли, додаючи до реакційної суміші лимону кислоту до рН 4,0. Потім суміш пропускали через Burdick&Jackson октадецил (C18) картридж. Продукт реакції – 13-гідропероксид лінолевої кислоти практично повністю сорбувався на гідрофобному носії. Картридж з сорбованим на ньому 13-гідропероксидом лінолевої кислоти промивали охолодженою водою. Продукт елюювали охолодженим метанолом, аналізуючи спектрофотометрично при $\lambda = 234$ нм ($\epsilon_m = 23000 \text{ (моль/дм}^3\text{)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) кількість гідропероксидів у кожній із фракцій. Вихід 13-гідропероксиду лінолевої кислоти склав 90 %. Чистоту препаратів 13-гідропероксиду лінолевої кислоти визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії використовуючи рефрактометричний детектор на колонці LiChrosorb RP-18 (Merk), рухома фаза – метанол : вода = 9 : 1 (0,1 % H_3PO_4 , v/v). Чистота препарату склала 99%. Препарат зберігали при температурі мінус 40 °С під аргоном.

2.2.11. Ферментативний синтез 15-гідропероксиду арахідонової кислоти.

Ферментативний синтез 15-гідропероксиду арахідонової кислоти проводили з використанням розчину 13-ліпоксигенази з сої [42, 176]. Реакційна суміш складалась з 0,1 М натрій - боратного буферу з рН 9,5; $0,16 \times 10^{-3}$ М арахідонової кислоти. Реакцію починали, добавляючи у суміш 3 мг ліпоксигенази. За перебігом реакції спостерігали по збільшенню поглинання при $\lambda = 234$ нм на Specord M-40 . Час перебігу реакції складав 10 хв. Реакцію зупиняли, додаючи до реакційної суміші лимону кислоту до рН 4,0. Потім суміш пропускали через Burdick&Jackson октадецил (C18) картридж. Продукт реакції – 15-гідропероксид арахідонової кислоти повністю сорбувався на гідрофобному носії. Картридж з сорбованим на ньому 15-гідропероксидом арахідонової кислоти промивали охолодженою водою. Продукт елюювали охолодженим метанолом, аналізуючи спектрофотометрично при $\lambda = 234$ нм ($\epsilon_m = 23000$ (моль/дм³)⁻¹*см⁻¹) кількість гідропероксидів у кожній із фракцій. Вихід 15-гідропероксиду арахідонової кислоти склав 92 %. Чистоту препаратів 15-гідропероксиду арахідонової кислоти визначали методом високоефективної рідинної хроматографії використовуючи рефрактометричний детектор на колонці LiChrosorb RP-18 (Merk), рухома фаза – метанол : вода = 9 : 1 (0,1% H₃PO₄, v/v). Чистота препарату склала 99%. Препарат зберігали при температурі мінус 40 °С під аргоном.

2.2.12. Визначення чистоти гідропероксидів полієнових жирних кислот із використанням обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії.

Визначення чистоти синтезованих гідропероксидів жирних кислот проводили методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії на колонці LiChrosorb RP-18 (Merck), рухома фаза - метанол : вода - 9 : 1 (0,1 % H_3PO_4 , v/v), використовуючи рефрактометричний детектор.

2.2.13. Дослідження впливу гідропероксидів полієнових жирних кислот на активність ліпоксигеназ в модельних системах, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні бульб картоплі.

Для отримання модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні, з бульб картоплі нарізали диски розміром 19 мм x 0,3 мм, інкубували при 25 °С протягом 0,5; 2 та 4 години в 0,05 М натрій-фосфатному буфері (рН 7,0) [172]. Потім диски відмивали охолодженою дистильованою водою, подрібнювали та гомогенізували у 2 об'ємах охолодженого 0,1 М Na-фосфатного буферного розчину (рН 6,0), що містив 1,27 мМ ЕДТА, 3,89 мМ аскорбінову кислоту, 2,93 мМ метабісульфіт натрію. Екстракцію проводили у присутності 0,1 % Brij-99 протягом однієї години при постійному повільному перемішуванні та температурі 4° С. Суміш відфільтровували через чотири шари марлі і центрифугували 40 хв (5000 об/хв, центрифуга РС-6). Визначення активності ферментів 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 $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [175]. Активність ліпоксигенази визначали спектрофотометрично (спектрофотометр Specord M-40, «Carl Zeiss», Німеччина), реєструючи збільшення з часом оптичної густини реакційної суміші при $\lambda=234 \text{ нм}$, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Стандартна реакційна суміш містила: $0,1 \text{ M}$ натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3), $0,02 \%$ Lubrol PX, $0,1 \text{ mM}$ лінолеву кислоту. Визначення стаціонарної швидкості біоконверсії 13-гідропероксиду лінолевої кислоти проводили в реакційній суміші, що містила: $0,1 \text{ M}$ натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3), $0,02 \%$ Lubrol PX, 30 мкМ 13-гідропероксид лінолевої кислоти. Вимірювання проводили в термостатованій комірці при температурі $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції (V_{st}), яку представляли як середнє арифметичне трьох вимірів з відхиленням не більше 5% . 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).

2.2.14. Визначення активності гідропероксидліази картоплі.

Частково очищений препарат гідропероксидліази отримували з проростків картоплі, по схемі, що включала екстракцію в присутності $0,01 \%$ Вгіj-99, висолювання $25\text{-}50\%$ сульфатом амонію, діаліз, іонообмінну хроматографію на DEAE-Toyopearl. Визначення активності гідропероксидліази проводили у відповідності до методу [177] спектрофотометрично (спектрофотометр Specord M-40, «Carl Zeiss»,

Німеччина), реєструючи зменшення з часом оптичної густини реакційної суміші при $\lambda=235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Стандартна реакційна суміш містила: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3 та 6,5 відповідно для 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти), 0,02% Lubrol PX, 10-70 мкМ гідропероксид лінолевої кислоти. Реакцію ініціювали 2,5-10 мкг препарату гідропероксидліази.

2.2.15. Математична обробка результатів дослідів.

При побудові кінетичних залежностей використовували середні значення V_{st} , які визначали мінімум з трьох вимірювань (різниця між величинами становила не більше 5%). Для більшості розрахованих констант було визначено середнє квадратичне відхилення (σ) від середньої арифметичної величини (M). Відношення середньої арифметичної величини до середньої похідної середньої арифметичної для розрахованих констант не перевищувало 3 [178]. Статистичний аналіз даних включав визначення $M \pm m$, де M – середня величина, m – її стандартна похибка, кількість біологічних повторів $n = 3-6$. Результати експериментів оцінювали t -тесту критерій, що використовували Стьюдента. Для порівняння показників досліджуваних груп використовували U - критерій Мана-Вітні (Mann-Whitney U -test). Значення $p < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. ВПЛИВ 24-ЕПІБРАССИНОЛІДУ НА ЛІПОКСИГЕНАЗИ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ ЗА ДІЇ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Ліпоксигенази - ферменти, які каталізують окиснення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що містять 1,4-цис, цис-пентадієнову систему, з утворенням гідропероксидів транс-, цис-кон'югованих дієнів. Подальші перетворення гідропероксидів полієнових жирних кислот ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення фізіологічно активних сполук – оксиліпінів, серед яких рослинний гормон - жасмонова кислота, сполуки з бактерицидною і фунгіцидною активністю [1, 3].

В умовах *in vivo*, за дії стресових чинників показана індукція активності та зміна рівня транскриптів генів ліпоксигеназ [77, 161, 164, 179]. Експресія генів ферментів ліпоксигеназного шляху перетворення поліненасичених жирних кислот модулюється також сигнальними молекулами (жасмонова, саліцилова та абсцизова кислота) [71, 93, 96-98, 164]. Участь ліпоксигеназної сигнальної системи в індукованій брассиностероїдами (БС) відповіді рослинної клітини показано в роботі [8], проте безпосередній вплив брассиностероїдів на активність ферментів ліпоксигеназного шляху метаболізму поліненасичених жирних кислот не досліджено. Наразі існують повідомлення, що як брассиностероїди, так і жасмонова кислота, стимулюють експресію стрес-залежних генів (OPR3, LOX2) [134, 135, 180], що вказує на можливість існування зв'язку між дією брассиностероїдів та рівнем ліпоксигеназних метаболітів.

Ріст рослин за допомогою подовження та поділу клітин вимагає координації кількох процесів, на функціонування деяких з них вочевидь впливають брассиностероїди. Ці сполуки позитивно регулюють експресію генів, функції яких пов'язані з збільшенням клітини та організації клітинної стінки [116], впливають на форму та розмір клітини шляхом регуляції динаміки мікротрубочок [141, 142]. Припускають, що брассиностероїди впливають на проліферацію клітин, хоча результати досліджень, в яких використовувалися різноманітні клітинні культури та види рослин, є суперечливими [120, 121, 143].

Проведено серію дослідів по визначенню довжини 5-денних проростків кукурудзи, що вирощувались у відсутності та у присутності 10^{-6} і 10^{-8} М 24-епібрасиноліду (24-ЕБР). Істотні зміни у довжині проростків спостерігались лише за дії 10^{-6} М 24-епібрасиноліду; довжина проростка зменшувалась на 34 % у порівнянні з контролем (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Довжина проростків кукурудзи, що вирощувались у відсутності та у присутності 10^{-6} і 10^{-8} М 24-епібрасиноліду ($M \pm m$ (n))

Концентрація 24-епібрасиноліду	Довжина проростка, мм	Довжина мезокотилію, мм
Контроль	145,16 ± 3,65 (82)	75,78 ± 1,98 (82)
10^{-8} М ЕБР *	148,46 ± 3,96 (78)	74,58 ± 2,26 (78)
10^{-6} М ЕБР *	95,13 ± 2,31 (85)	44,28 ± 1,62 (85)
10^{-8} М ЕБР **	154,90 ± 4,21 (77)	71,34 ± 2,36 (77)
10^{-6} М ЕБР **	150,71 ± 3,09 (82)	78,98 ± 9,00 (82)

*Обробка насіння та вирощування рослин у присутності 24-епібрасиноліду

**Обробка насіння у присутності 24-епібрасиноліду

Це може свідчити про пригнічення ростових процесів надлишковими концентраціями фітогормону. За дії 24-епібрасиноліду також помітно тенденцію до збільшення відношення довжини мезокотилію до довжини всього проростку. Було встановлено, що за таких умов довжина всього проростку кукурудзи та, зокрема, мезокотилію, зменшується відповідно на 34 та 42 %. Екзогенна дія 24-епібрасиноліду збільшує суху вагу проростків на 16-53 % (табл. 3.2). Збільшується також відношення сухої ваги до сирої ваги, порівняно з контролем, що може вказувати на інтенсифікацію накопичення органічних речовин під дією брасиностероїдів. Розподіл цих органічних сполук відбувається нерівномірно. Зокрема, 24-епібрасинолід зменшує сиру вагу мезокотилію і майже не впливає на зміну сухої ваги, тобто спостерігається вкорочення та потовщення мезокотилію. Іншу дію фітогормон проявляє на колеоптиль. Під дією 24-епібрасиноліду збільшується як сира, так і суха вага колеоптилю на 59,6 % і на 85,7 %, відповідно (наведені максимальні відсотки). Гетеротрофний період є критичним для проростання рослини, оскільки основне живлення та утворення енергії відбувається за рахунок запасних поживних речовин і таке накопичення органічних речовин під впливом брасиностероїдів може мати певну адаптаційну направленість. Ріст рослин внаслідок подовження та поділу клітин вимагає координації декількох процесів, на регуляцію яких показано вплив брасиностероїдів. Але спроби пояснити механізм виникнення ростових реакцій, що пов'язані з дією брасиностероїдів, на даний час лишаються безуспішними. Разом з тим отримано великий обсяг даних, що свідчать про існування складних взаємодій між брасиностероїдами та іншими гормонами рослин, впливі на клітинні процеси, властивості мембран та активність ферментів.

Таблиця 3.2

Вага 10 проростків кукурудзи при вирощуванні рослин в звичайних умовах (контроль) та у присутності 10^{-6} і 10^{-8} М 24-епібрасиноліду

Концентрація 24- епібрасинолі ду	Цілий проросток			Мезокотиль			Колеоптіль		
	сира вага, г	суха вага, г	суха вага/сира вага, %	сира вага, г	суха вага, г	суха вага/сира вага, %	сира вага, г	суха вага, г	суха вага/сира вага, %
Контроль	5,24	0,43	8,2 %	2,14	0,15	7,2 %	3,10	0,28	9,0 %
10^{-8} М ЕБР*	6,71	0,66	9,8 %	1,76	0,14	7,9 %	4,95	0,52	10,5 %
10^{-6} М ЕБР*	4,86	0,51	10,5 %	1,68	0,15	8,7 %	3,18	0,36	11,5 %
10^{-8} М ЕБР**	6,39	0,50	7,8 %	1,89	0,14	7,3 %	4,50	0,36	8,0 %
10^{-6} М ЕБР**	5,92	0,53	9,0 %	1,95	0,16	8,0 %	3,97	0,38	9,5 %

*Обробка насіння та вирощування рослин у присутності 24-епібрасиноліду

**Обробка насіння у присутності 24-епібрасиноліду

Літературні дані і результати, які отримані в лабораторії хімії стероїдів ІБОХ НАН Біларусі, свідчать про виражену здатність brassinosteroidів підвищувати стійкість рослин до впливу низьких або високих температур. Відмічено, що під дією brassinosteroidів в умовах як низької, так і високої температури, помітно посилюється загальний синтез білка із зміною складу, в якому спостерігається збільшення утримання як високо- так и низькомолекулярних білків, що свідчить про підвищення термостійкого білкового синтезу, який супроводжується підвищенням термостійкості мембран та білоксинтезуючої системи клітин рослини. На даний час практично відсутні дані, які розкривають механізм дії brassinosteroidів при температурному стресі. Досвід дослідження brassinosteroidів дає підстави припустити, що існує взаємозв'язок між БС-сигналінгом і станом фосфоліпідного обміну, а також індукцією захисних механізмів рослинної клітини, що включають синтез білків холодового шоку, регуляцію ферментативної активності (зокрема, ферментів ліпоксигеназної сигнальної системи та фосфоліпаз) та адаптацію антиоксидантної системи клітини до дії низьких температур.

В серії експериментів по дослідженню впливу 24-епібрасинолідів на функціонування ліпоксигеназ з проростків кукурудзи були підібрані оптимальні умови для визначення активності 9-ліпоксигенази, що каталізує реакцію утворення 9-гідропероксидів полієнових жирних кислот, та 13-ліпоксигенази, що каталізує реакцію утворення 13-гідропероксидів поліненасичених жирних кислот [171].

Підбір умов для визначення активності ліпоксигеназ проводили з урахуванням фізико-хімічних особливостей протікання реакції окиснення лінолевої кислоти як практично водонерозчинної сполуки за нейтральних та кислих рН. Ферментативна активність різних ліпоксигеназ суттєво залежить від агрегатного стану субстрату реакції,

pH реакційної суміші, наявності природних та синтетичних амфіфільних сполук, таких як фосфоліпіди та детергенти [41, 164, 171, 181-184]. Оптимальні значення pH дії різних ліпоксигеназ варіюють від 5,5 до 9,5. У такому широкому діапазоні pH неминучі зміни ступеню іонізації і, відповідно, агрегатного стану ПНЖК від емульсії до істинного розчину [185]. Наші попередні дослідження свідчать, що ліпоксигенази належать до двох класів, перший віддає перевагу водорозчинній формі субстрату (іонізовані поліненасичені жирні кислоти у концентраціях нижчих за критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ), другий - окиснює агреговану форму субстрату (а саме, у складі мембран або міцел) [153]. Типовим представником першого класу є 15- ліпоксигеназа з соєвих бобів (LO-1), яка проявляє ферментативну активність за умов лужного pH середовища та окиснює іонізовану форму субстрату у вигляді істинного молекулярного розчину. Інгібуючий вплив на активність цього ферменту спричиняють поверхнево-активні сполуки, такі як Tween-20, Brij-35, Lubrol PX, Triton X-100, аерозоль OT та ін. Такий ефект обумовлений ефективною абсорбцією субстрату з водної фази у міцелярну, а не прямою взаємодією ферменту з детергентом. Представником другого типу є ліпоксигеназа з бульб картоплі, яка каталізує окиснення нерозчинної форми субстрату у складі міцелярної фази утвореної Lubrol PX [41, 181-184] і проявляє максимальну активність при pH 6,3. Відомо, що 5-денні проростки кукурудзи містять два фермента - ліпоксигенази L1 та L2 [171]. Встановлено, що основними продуктами окиснення лінолевої кислоти ліпоксигеназою L1 є 13-гідропероксид лінолевої кислоти (13-ліпоксигеназа), а продуктом окиснення того ж субстрату за участю ліпоксигенази L2 - 9-гідропероксид лінолевої кислоти (9-ліпоксигеназа).

З метою встановлення оптимальних умов функціонування 9-ліпоксигенази з мезокотилію кукурудзи нами було визначено залежність стаціонарної швидкості реакції окиснення субстрату - лінолевої кислоти від рН реакційного середовища та концентрації субстрату в присутності детергенту Lubrol PX. На рис. 3.1 представлено залежності активності

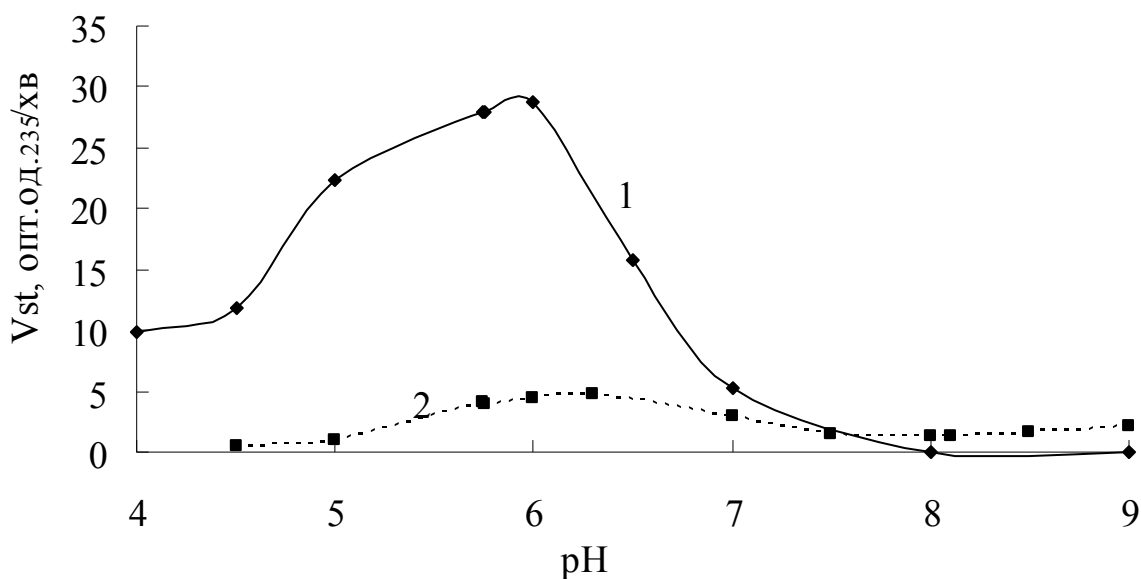


Рис. 3.1. Залежності активності 9-ліпоксигенази з мезокотилію проростків кукурудзи від рН реакційного середовища за дії 1 мкМ 24-епібрасинолідом (крива 1) та в контрольних рослинах (крива 2)

9-ліпоксигенази з мезокотилію проростків кукурудзи від рН реакційного середовища за дії 1 мкМ 24-епібрасинолідом (крива 1) та в контрольних рослинах (крива 2). Встановлено, що оптимальним для протікання реакції 9-ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти є рН 6,0 (рис. 3.1), що узгоджується з даними інших авторів [171].

На рис. 3.2 представлено залежності активності 13-ліпоксигенази з мезокотилію проростків кукурудзи від рН за дії 1 мкМ 24-епібрасинолідом (крива 1) та в контрольних рослинах (крива 2). Як видно

з рис. 3.2, оптимальними умовами проходження реакції 13-ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти є рН 7,0.

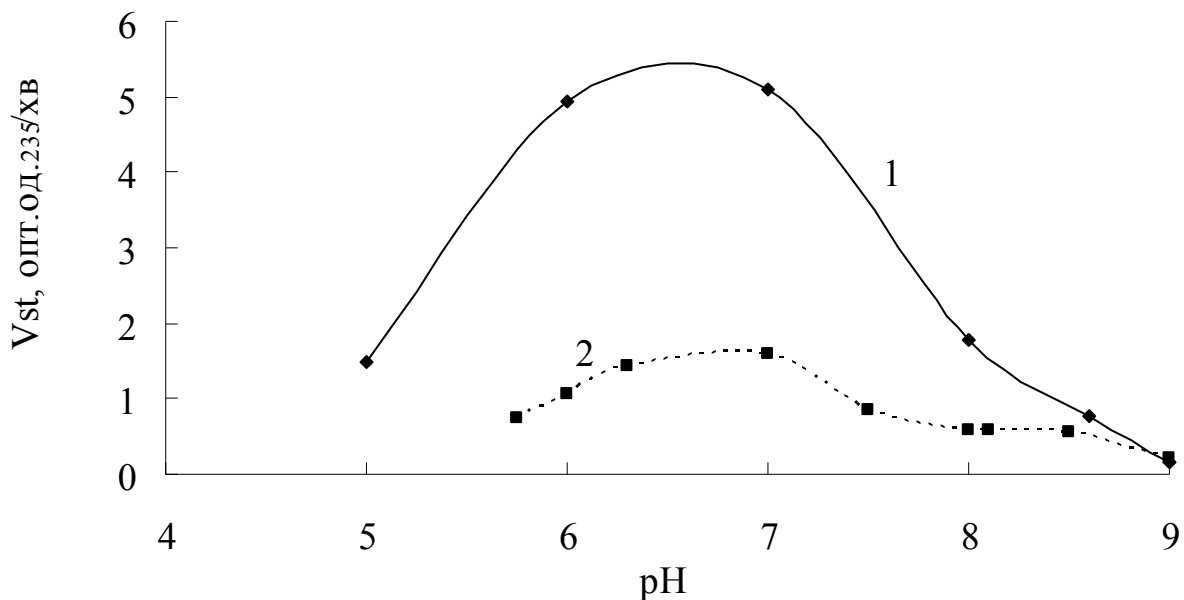


Рис. 3.2. Залежності активності 13-ліпоксигенази з мезокотиллю проростків кукурудзи від рН за дії 1 мкМ 24-епібрасиноліду (крива 1) та в контрольних рослинах (крива 2)

На рис. 3.3 представлено залежності активності 9-ліпоксигенази в мезокотиллях проростків кукурудзи необроблених (крива 1) та оброблених 10^{-6} М 24-епібрасинолідом (крива 3) рослин від концентрації лінолевої кислоти. Встановлено, що в діапазоні концентрацій лінолевої кислоти 80 - 150 мкМ різниця в значеннях стаціонарних швидкостей не перевищує 5 %, тому подальші дослідження проводили у присутності 100 мкМ лінолевої кислоти, яку вважали насичуючою для ферменту за даних умов. Отже, для вивчення впливу 24-епібрасиноліду та низьких температур на активність 9-ліпоксигенази в подальших дослідах використовували реакційну суміш,

що містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,0); 0,02 % Lubrol PX та 100 мкМ лінолеву кислоту.

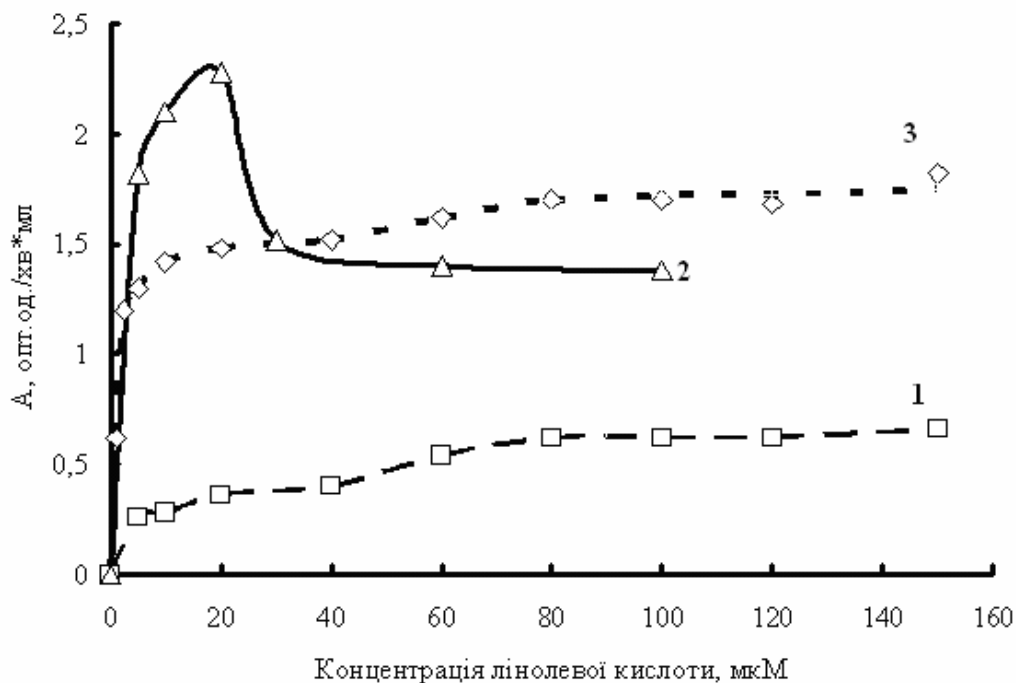


Рис. 3.3. Залежність активності 9-ліпоксигенази (1,3) та 13-ліпоксигенази (2) з проростків кукурудзи, необробленої (1,2) та обробленої 10^{-6} М 24-епібрасинолідом (3), від концентрації субстрату - лінолевої кислоти

Використовуючи відмінність в субстратній специфічності 9- та 13-ліпоксигеназ кукурудзи [171], нами було проведено порівняльне визначення стаціонарних швидкостей реакцій окиснення арахідонової та лінолевої кислот. Встановлено, що стаціонарна швидкість окиснення арахідонової кислоти за даних умов складає всього $1,53 \pm 0,46\%$ від стаціонарної швидкості окиснення лінолевої кислоти, що свідчить про відсутність прояву активності іншого ферменту - 13-ліпоксигенази. Як відомо [171], 13-ліпоксигеназа кукурудзи здібна використовувати як

специфічний субстрат не тільки лінолеву кислоту, а і арахідонову. З огляду на те, що частка водорозчинної форми арахідонової кислоти при рН 6,0 в системі, що містить міцели Lubrol PX, досить незначна порівняно з мембранозв'язаною, підбір умов для визначення активності 13-ліпоксигеназ проводили у відсутності детергенту, спроможного абсорбувати полі ненасичену жирну кислоту і, таким чином, виводити її із сфери реакції. На рис. 3.3, крива 2 представлено залежність активності 13-ліпоксигенази від концентрації субстрату -лінолевої кислоти в реакційному середовищі. Отже, для вивчення впливу 24-епібрасинолідів та низьких температур на активність 13-ліпоксигенази в подальших дослідках використовували реакційну суміш, що містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0) та 20 мкМ лінолеву кислоту. Порівняльне визначення стаціонарних швидкостей реакцій окиснення арахідонової та лінолевої кислот за даних умов показало, що стаціонарна швидкість окиснення арахідонової кислоти складає $100,8 \pm 10,1\%$ від стаціонарної швидкості окиснення лінолевої кислоти, що свідчить про прояв активності 13-ЛО кукурудзи. Лінолева кислота в концентраціях, що перевищують 20 мкМ, різко пригнічує швидкість 13-ліпоксигеназної реакції (крива 2, рис. 3.3). Це обумовлено тим, що ККМ для молекул лінолевої кислоти при рН 7,0 більше 20 мкМ [174], а за таких умов відбувається утворення міцел лінолевої кислоти і виведення субстрату із зони взаємодії з ферментом. В подальшому для порівняння активності 13-ліпоксигеназ, виділених з необроблених та оброблених 24-епібрасинолідом та вирощених за нормальних та низьких температур проростків кукурудзи, використовували реакційну суміш, що містила 0,1М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0) та 20 мкМ лінолеву кислоту.

Результати дослідження впливу 24-епібрасиноліду на активність 9- та 13-ліпоксигеназ з мезокотилію проростків кукурудзи за нормальних умов вирощування рослин та за дії низькотемпературного стресу представлено на рис. 3.4 та 3.5.

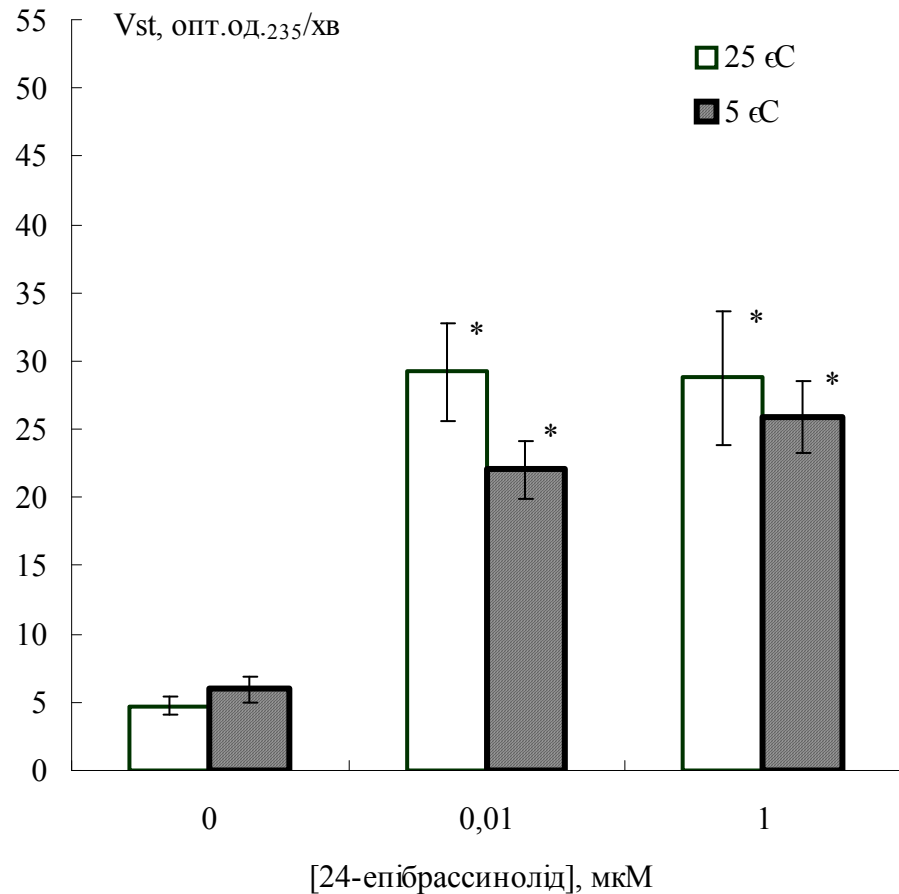


Рисунок 3.4. Вплив 24-епібрасиноліду на активність 9-ліпоксигенази в проростках кукурудзи за нормальних умов вирощування рослин (25 °C) та в умовах низькотемпературного стресу (5 °C), $M \pm m$ ($n = 3-6$), * зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової температури: 25 °C та 5 °C), ** зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової концентрації 24-епібрасиноліду)

Показано, що активність ліпоксигеназ з мезокотилію рослин, які було оброблено 24-епібрасинолідом в концентрації 10^{-8} та 10^{-6} М, за

нормальних умов вирощування проростків зростає більш ніж в тричі (рис. 3.5.) та більш ніж в 6 разів (9-ЛЮ, рис. 3.4).

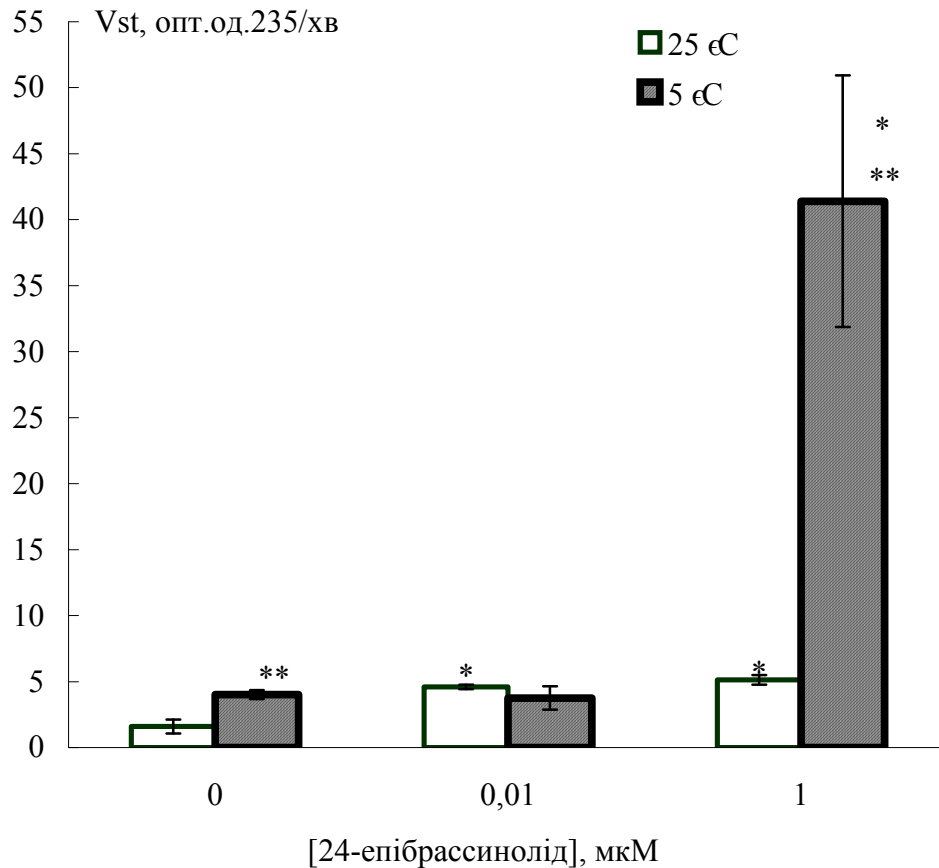


Рис. 3.5. Вплив 24-епібрасиноліду на активність 13-ліпоксигенази в проростках кукурудзи за нормальних умов вирощування рослин (25 °C) та в умовах низькотемпературного стресу (5 °C), $M \pm m$ ($n = 3-6$), * зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової температури: 25 °C та 5 °C), ** зміни статистично достовірні, $p < 0,05$ (за умов однакової концентрації 24-епібрасиноліду)

В умовах низькотемпературного стресу активність 9-ліпоксигенази під впливом 24-епібрасиноліду (10^{-8} та 10^{-6} М) підвищується в 4 рази порівняно з контролем, в той час як активність 13-

ліпоксигенази зростає майже в 10 разів під впливом 10^{-6} М 24-епібрасиноліду, а при 10^{-8} М змін не спостерігалось (рис. 3.5). Порівняльний аналіз активності 13-ліпоксигенази на фоні 25 °С та 5 °С показав сумісний ефект низької температури та 24-епібрасиноліду (10^{-6} М), який перевищує втричі ефект дії сполуки при 25°С. Навпаки, активність 9-ліпоксигенази на фоні низької температури зростає в меншій мірі (в 1,4 рази менше, ніж при 25 °С). Порівняння дії 24-епібрасиноліду (10^{-6} М) на активність 13-ліпоксигенази при 25 °С та 5 °С виявило 8-кратне зростання в умовах низької температури, в той же час достовірні зміни в активності 9-ліпоксигенази не були виявлені. Більш виражений стимулюючий ефект 24-епібрасиноліду (10^{-6} М) на 13-ліпоксигеназу на фоні низької температури свідчить про інтенсифікацію 13-ліпоксигеназного шляху перетворення поліненасичених жирних кислот за таких умов.

Оскільки 13-ліпоксигеназа є ключовим ферментом синтезу жасмонової кислоти, вірогідним є підвищення рівня останньої при дії 24-епібрасиноліду на рослинну клітину при дії холоду. Ефект дослідженої сполуки на 9-ліпоксигеназу є теж стимулюючим, але майже однаковим при різних температурах. Наші результати вказують на залучення ліпоксигеназної системи у відповіді рослинної клітини на дію 24-епібрасиноліду, зокрема, в умовах зниження температури оточуючого середовища.

З літературних даних відомо, що brassinosteroids захищають рослину від різноманітних стресових факторів, а саме - високої та низької температур, посухи, підвищеної концентрації солі, механічних ушкоджень [66, 114, 180]. Відомо і про участь ліпоксигеназ у адаптації рослин до дії стресових чинників [77, 161, 164, 179]. Ліпоксигеназні метаболіти - це низка біологічно-активних речовин під загальною

назвою – оксиліпіни [1, 160, 186], серед яких - жасмонова кислота та жасмонати [1, 3]. Біосинтез жасмонової кислоти відбувається шляхом окиснення α -ліноленової кислоти, що каталізується 13-ліпоксигеназою, до 13-гідропероксиду ліноленової кислоти, до каскаду ферментативних реакцій утворення даної сполуки залучена 10, 11-редуктаза 12-оксофітодієнової кислоти (OPR) [187]. Відомо, що brassinosteroids стимулюють експресію стрес-залежних генів OPR3, LOX2 та інших [134, 135, 180]. Щодо впливу 24-епібрасинолідів на функціональну активність ліпоксигеназ, було показано збільшення рівня продуктів ліпоксигеназного окиснення під дією даного гормону, тоді як 4-бромфенацилбромід, інгібітор фосфоліпази A2, суттєво знижував кількість ліпоксигеназних метаболітів [8]. Автори вважають, що оксиліпінова відповідь клітини пояснюється скоріше змінами у ферментативній активності (можливо, як результат фосфорилування / дефосфорилування ферментів, або переведення їх з проферментної форми), ніж індукованими 24-епібрасинолідом або 4-бромфенацилбромідом змінами в рівні біосинтезу ферментів. З іншого боку, встановлено вплив продуктів ліпоксигеназного метаболізму - 9(Z)-12-гідрокси-9-додеценної кислоти (12-ГДК) та метилжасмонату на фосфорилування білків рослин [188, 189]. Фосфорилування білків за дії 12-ГДК може вказувати як на існування протеїнкіназ, що активуються даною сполукою безпосередньо, так і на ініціацію сукупності сигнальних систем клітини (аденілатциклазної, кальцієвої, НАДФ-оксидазної та, можливо, і «власної» ліпоксигеназної). Цікавим є і той факт, що рівень фосфорилування білка з молекулярною вагою біля 15 кДа підвищується більше ніж в 10 разів при низькій температурі, що супроводжується підвищенням морозостійкості рослин [190].

В реалізації молекулярних механізмів дії фітогормонів приймають участь фосфоліпази, продукти яких є субстратами ліпоксигеназ (полієнові жирні кислоти) або регуляторами активності (фосфатидна кислота). В тваринних та рослинних організмах присутні мембранозв'язані фосфоліпази D (ФЛД), що активуються олеїноювою кислотою [157-159] - олеат-залежні ФЛД, підвищений рівень експресії яких спостерігається в старому листі, стеблі, квітах, коренях порівняно з молодим листям та проростками [157]. Також відомо, що олеїнова кислота ефективно підвищує активність ліпоксигенази з коренів огірка [191] на відміну від фосфатидної кислоти, яка в концентрації 0,5 мМ пригнічує фермент.

З метою з'ясування дії фосфатидної кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи в умовах *in vitro*, проведено експерименти по вивченню залежності активності ферментів від кількості фосфатидної кислоти в реакційних сумішах. Результати цих експериментів представлено на рис. 3.6. Встановлено суттєву активацію 13-ліпоксигенази за дії низьких концентрацій фосфатидної кислоти (< 10 мкМ) на фоні відсутності змін в активності 9-ліпоксигенази в такому діапазоні дії фосфоліпиду. Навпаки, в межах 10 - 20 мкМ фосфатидна кислота істотно підвищує активність саме 9-ліпоксигенази. Ріст активності обох ферментів в присутності різних кількостей фосфатидної кислоти - метаболіту фосфоліпаз, свідчить про її можливу участь в підтриманні певного рівня ліпоксигеназних метаболітів (в тому числі, жасмонової кислоти) при адаптації рослинної клітини до несприятливих умов зовнішнього середовища.

Отже, за літературними даними та у відповідності до отриманих нами результатів, індукована 24-епібрассинолідом зміна активності 9- та 13-ліпоксигеназ, може вказувати на ініціацію цілої сукупності

сигнальних систем клітини, зокрема, ліпоксигеназної сигнальної системи, що має забезпечити реалізацію антистресових програм при адаптації рослини до несприятливих умов зовнішньої середовища.

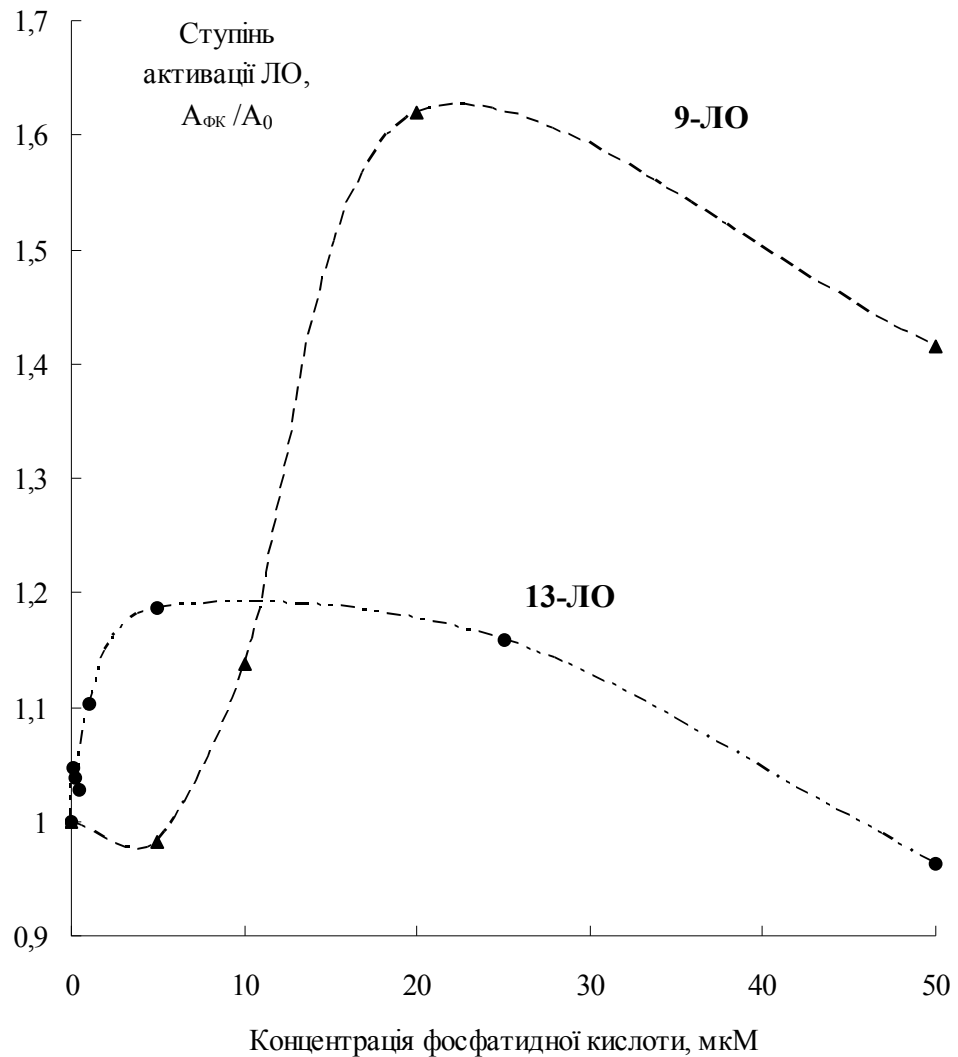


Рис. 3.6. Залежності активності ліпоксигеназ з мезокотилію проростків кукурудзи від концентрації фосфатидної кислоти (ФК). Ступінь активації ЛО визначали із співвідношення активності ЛО в присутності та у відсутності фосфатидної кислоти в реакційній суміші.

Таким чином, досліджено вплив 24-епібрасиноліду на активність 9- та 13-ліпоксигеназ в мезокотилі проростків кукурудзи за нормальних умов та в умовах низькотемпературного стресу. Встановлено, що активність 9- та 13-ліпоксигеназ з рослин, що були оброблені 24-епібрасинолідом в концентрації 0,01 мкМ та 1 мкМ за нормальної температури вирощування проростків, зростає в 3 та 6 разів відповідно.

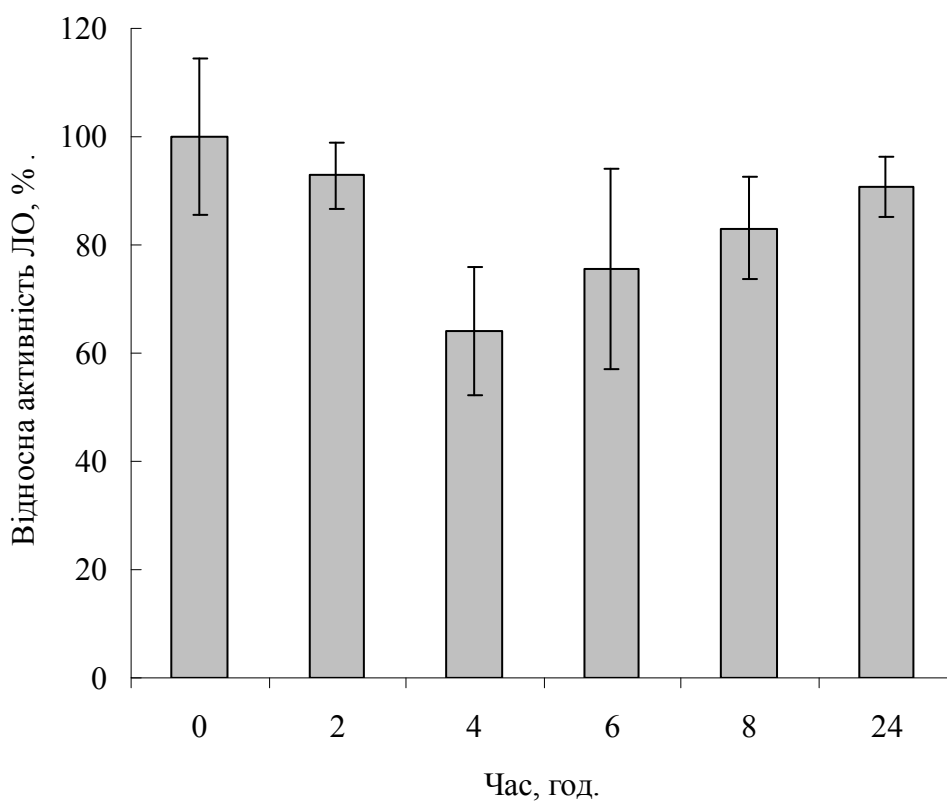
В умовах низькотемпературного стресу 9- ліпоксигеназна активність під впливом 24-епібрасиноліду підвищується в 4 рази порівняно з контролем, в той час як 13- ліпоксигеназна активність зростає більш ніж в 10 разів під впливом 1 мкМ 24-епібрасиноліду. Підвищення активності ферментів при введенні 24-епібрасиноліду за дії низькотемпературного стресу може бути свідченням потенційного зв'язку між дією брасиностероїдів та рівнем окиснених похідних поліненасичених жирних кислот, що утворюються в результаті ліпоксигеназних реакцій. Отримані нами відомості про залучення 9- та 13- ліпоксигеназних шляхів перетворення полієнових жирних кислот в формування відповіді рослинної клітини на дію брасиностероїдів в умовах низькотемпературного стресу розширюють існуючі на сьогоднішній день уявлення щодо механізму впливу даних гормонів на рослинну клітину за дії низьких температур.

3.2. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСОРА ТА АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ ЛІПОКСИГЕНАЗ КУКУРУДЗИ

При дії на рослини несприятливих факторів середовища (засолення або затоплення ґрунтів, водний дефіцит, посуха) змінюється напрям метаболічних процесів та активуються захисні механізми рослинної клітини. Стрес пригнічує ріст та розвиток рослин та призводить до зниження їх продуктивності. Ферменти та продукти ліпоксигеназної сигнальної системи відіграють значну роль у формуванні адаптації рослини до дії стресових чинників [16, 59, 164]. За умов дії осмотичного стресу в рослині накопичується абсцизова кислота (АБК), що обумовлює зміни в регуляції експресії генів та метаболізмі клітини [104]. Роль фітогормону АБК в регуляції ліпоксигеназної активності в рослинах є не ясною. Є лише окремі дані про вплив АБК на ліпоксигенази [69, 76, 164]. За літературними даними, АБК інгібує активність ключового ферменту оксиліпінового каскаду - ліпоксигеназу [1, 169], підвищення вмісту АБК корелює зі зменшенням активності ЛО [79]. Встановлено [99], що при обробці листя АБК накопичення lox2 та lox3 практично не відбувається, але має місце індукція АБК-чуттєвого інгібітору протеїназ. Відомо, що АБК не тільки не підвищує експресію ліпоксигеназних генів сої, але навіть зменшує активність LOX2 та не впливає на LOX1 [76], а в умовах осмотичного стресу відбувається підвищення рівня відповідних мРНК, вмісту білку та специфічної активності ліпоксигеназ. Показано також, що обробка АБК проростків кукурудзи призводить до активації 9-ліпоксигеназ в більшій мірі, ніж 13-ліпоксигеназ [167]. Залучення ліпоксигеназ у інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів за дії сольового стресу показано для клітин *Citrus sinensis* L. [161], описано кореляцію між зростанням

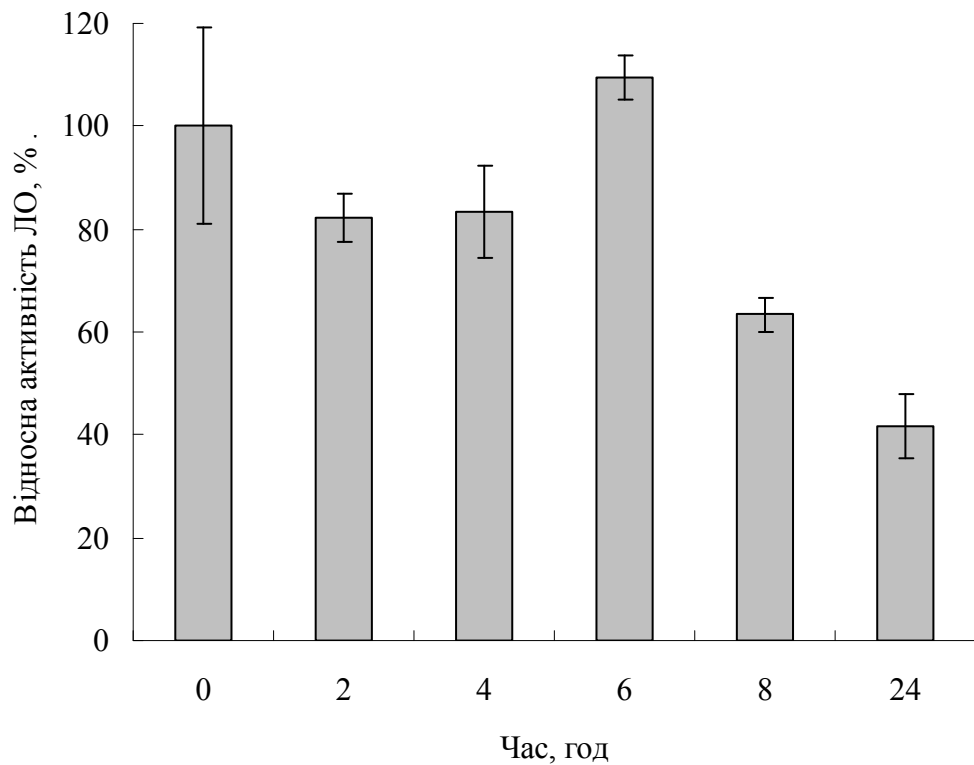
концентрацій АБК та транскриптів ліпоксигеназ при водному дефіциті [168]. Є відомості про одночасне зростання ліпоксигеназної активності та вмісту АБК, жасмонової кислоти при механічному ушкодженні [170].

В серії експериментів по дослідженню функціонування 9- та 13-ліпоксигеназ з проростків кукурудзи в умовах сольового стресу аналізували зміни в активності обох ліпоксигеназ по відношенню до активності в контрольних рослинах. На рис. 3.7 та рис. 3.8 представлено



9-ЛО

Рис. 3.7. Динаміка змін активності 9-ліпоксигенази (9-ЛО) в проростках кукурудзи (мезокотиль) за дії 0,2М NaCl. Активність ферменту визначали у 0,1 М Na-фосфатному буферному розчині (рН 6,0); 0,02% Lubrol PX; 0,1 мМ ЛК. За 100 % приймали активність ферменту в контрольних рослинах



13-ЛО

Рис. 3.8. Динаміка змін активності 13-ліпоксигенази (13-ЛО) в проростках кукурудзи (мезокотиль) за дії 0,2М NaCl. Активність ферменту визначали у 0,1 М Na-фосфатному буферному розчині (рН 7,0); 0,02 мМ ЛК (13ЛО). За 100 % приймали активність ферменту в контрольних рослинах

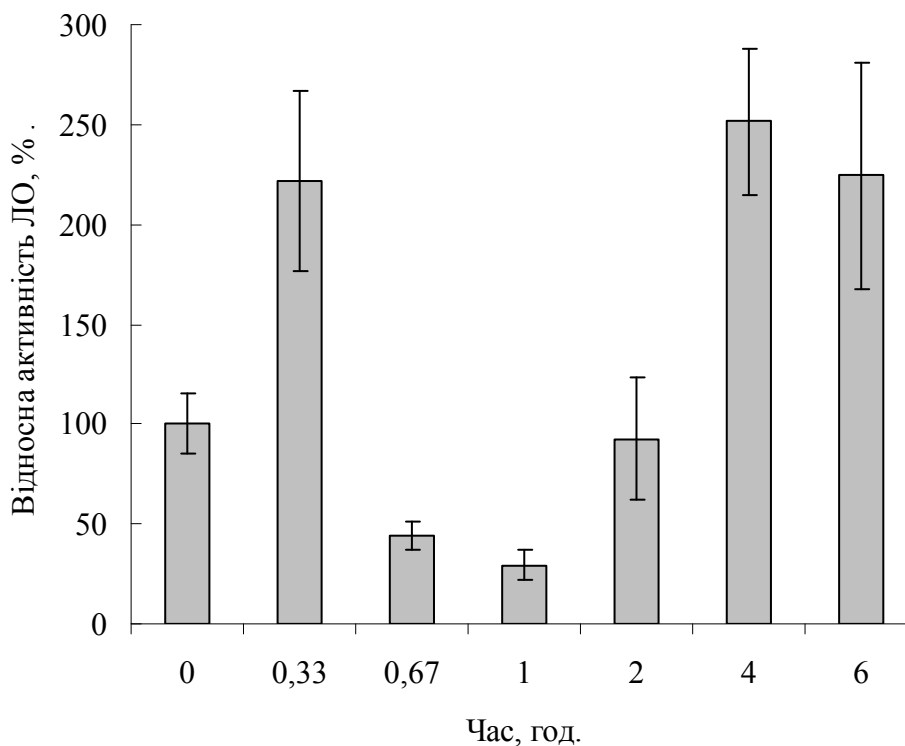
залежність відносної активності 9- та 13-ліпоксигеназ від часу дії стресового чинника - підвищеної концентрації солі (0,2М NaCl) на 5-денні проростки кукурудзи. Зниження активності 9-ліпоксигенази спостерігається на 4 годину дії стресового чинника (залишкова активність - 64 %) з поступовим поверненням за проміжок часу 6 - 24 години до базального рівня (рис. 3.7)

13-ліпоксигеназа практично не змінює активності в перші шість години, а на 8 і 24 годину різко знижується відповідно на 37 та 58 % по

відношенню до рівня активності в контрольних рослинах. Отже, в умовах сольового стресу на ранніх етапах (4 години) знижується функціональна активність 9-ліпоксигенази та практично не змінюється активність 13-ліпоксигенази, і навпаки, нормалізація активності 9-ліпоксигенази на 6 - 24 години супроводжується різким зниженням активності 13-ліпоксигенази на 8-24 годині дії сольового чинника. Таким чином, можна зробити припущення про розділений в часі відгук на стресовий фактор з боку ліпоксигеназ, що синтезують оксиліпіни з певними фізіологічними властивостями.

В чому ж може бути причина змін в функціонуванні обох ферментів? Існують свідчення про антагонізм дії АБК та жасмонатів як регуляторів експресії індукованих сольовим стресом білків [192]. З огляду на різке зниження активності ключового ферменту синтезу жасмонової кислоти - 13-ліпоксигенази, можна допустити, що накопичення АБК в умовах сольового стресу провокує зміни в функціонуванні ферменту. Результати досліджень ліпоксигеназних активностей в меристемі проростків після інкубування їх в присутності 10 мкМ АБК протягом 0,33 - 6 годин представлено на рис. 3.9 та 3.10. Активність ферменту в меристемі контрольних рослин приймали за 100 %. Встановлено значне підвищення активності 9-ліпоксигенази (більше ніж в два рази) на 0,33 годині дії АБК з одночасним різким зниженням активності 13-ліпоксигенази в цей період. Інкубація проростків з АБК протягом 0,67 - 1 години виявила суттєве зростання активностей обох ліпоксигеназ. У випадку 9-ліпоксигенази суттєве зменшення активності спостерігається на 1 годині дії АБК (майже на 75 % від контрольного показника активності ферменту). В період же 2 - 6 годин дії гормону суттєвих змін в активності 13-ліпоксигенази не спостерігається, а активність 9- ліпоксигенази на 4 і 6 годину в 2 - 2,5 рази перевищує вихідну активність ферменту. Отже, АБК може як інтенсифікувати, так і

інгібувати в залежності від часу дії активність 9-ліпоксигенази, в той же час в перші хвилини дії АБК спостерігається пригнічення активності 13-ліпоксигенази.

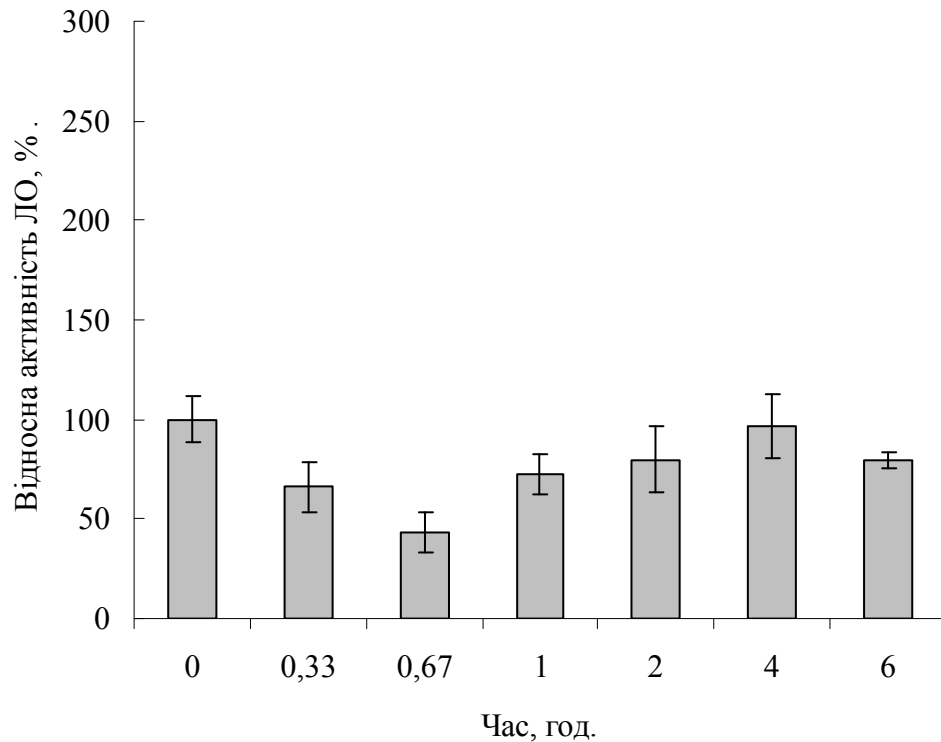


9-ЛО

Рис. 3.9 Динаміка змін активності 9-ліпоксигенази (9-ЛО) в меристемі проростків кукурудзи за дії 10 мкМ АБК. Активність ферменту визначали у 0,1 М Na-фосфатному буферному розчині (рН 6,0); 0,02% Lubrol PX; 0,1 мМ ЛК. За 100 % приймали активність ферменту в контрольних рослинах

Вивчення ефекту АБК на спектр продуктів 9- та 13- ліпоксигеназ, виділених на різних етапах розвитку зародків кукурудзи [167] виявило значне підвищення частки 9-ліпоксигеназних метаболітів та незначну кількість 13-ліпоксигеназних метаболітів. Є дані про підвищення під впливом АБК стійкості рослин [63], але механізми захисної дії цих сполук недостатньо з'ясовані. Відомо також, що в рослинних тканинах в

процесі росту та розвитку змінюється активність ліпоксигеназ та їх ізоферментний склад [68-70].



13-ЛО

Рис. 3.10. Динаміка змін активності 13- ліпоксигенази (13-ЛО) в меристемі проростків кукурудзи за дії 10 мкМ АБК. Активність ферменту визначали у 0,1 М Na-фосфатному буферному розчині (рН 7,0); 0,02 мМ ЛК (13-ЛО). За 100 % приймали активність ферменту в контрольних рослинах

Згідно з уніфікованою концепцією стресу, яка включає концепцію Сел'є, у реакції рослин на стрес виділяють такі фази [62, 193]:

- відповіді – реакція тривоги, яка характеризується відхиленням від функціональної норми, зниженням життєздатності, активацією катаболічних процесів;

- відновлення – стадія опору, для якої є типовими процеси адаптації та репарації, розвиток стійкості;
- кінцеву – стадія виснаження, за якої має місце перевищення адаптаційного порогу, хронічне захворювання або загибель;
- регенерації – стадія відновлення, частково або повністю відновлюється фізіологічна функція після припинення дії стресору.

Інтенсифікація ліпоксигеназного метаболізму може здійснюватись не лише за рахунок активації присутніх в клітині ферментів, але і завдяки індукції експресії генів. Так спостерігається підвищення рівня мРНК, що кодують різні форми ліпоксигеназ, під впливом механічного ушкодження рослин [72, 164], осмотичного шоку [76], зміни температури, патогенів, фітогормонів [69, 80, 164] і т.ін. Стрес або сигнал можуть викликати неоднакову інтенсивність та залежне від часу накопичення транскриптів різних форм ліпоксигеназ [70, 72]. За дії абіотичних та біотичних стресорів на рослину відбувається вивільнення ненасичених полієнових жирних кислот із мембранних ліпідів - лінолевої та ліноленової кислот, які перетворюються ферментами ліпоксигеназної системи в низку фізіологічно активних сполук - оксиліпінів, що виконують функції стимуляторів росту, бактерицидів та фунгіцидів, і, таким чином, індують захисні реакції рослинної клітини [91]. Так, 9(Z)-12-гідрокси-9-додеценава кислота (12-ГДК) та метилжасмонат впливають на фосфорилування білків рослин [90] - універсальної ланки сигнальних систем регуляції активності багатьох ферментів. Передбачається, що можуть існувати або протеїнкінази, що активуються 12-ГДК безпосередньо, або дія сполуки ініціює цілу сукупність сигнальних систем клітини (аденілатциклазної, кальцієвої, НАДФ-оксидазної та, можливо, і «власної» ліпоксигеназної).

Рослинний гормон АБК сприяє стійкості рослини до ушкодження ймовірно шляхом активації біосинтезу жасмонової кислоти [103], вірогідно, активуючи ліпоксигеназну систему, що призводить до зростання перекисного окислення ліпідів мембран у АБК обробленому листі [166]. Цікавим є і той факт, що 30 % генів, що регулюються ліпоксигеназним метаболітом 9-гідрооктадекатрієною кислотою, індуюються АБК [4]. АБК спроможна здійснювати як активуючу, так і інактивуючу дію на експресію ЛО [104, 161].

Сприйняття та передача сигналу АБК в рослинній клітині - процес, в основі якого лежать тонкі молекулярні механізми, в яких задіяні ферменти ліпоксигеназної сигнальної системи, ліпоксигеназні метаболіти - жасмонова кислота, ГДК та інші. Отримані нами відомості про вплив сольового стресу та АБК на функціонування ліпоксигеназ свідчать про залучення ліпоксигеназної сигнальної системи в АБК-індуковану відповідь клітини. Встановлено, що різке підвищення активності 9-ліпоксигенази в перші години дії рослинного гормону АБК супроводжується зниженням активності 13-ліпоксигенази - ключового ферменту синтезу жасмонової і травминової кислот. Ініціація 9-ліпоксигеназного шляху за дії АБК як стресового гормону свідчить не тільки про взаємозв'язок двох сигнальних систем рослинної клітини, а і розширює існуючі на сьогоднішній день уявлення про функціональне значення цієї низки оксиліпінів, роль яких в метаболічних процесах рослинної клітини остаточно не з'ясована.

3.3 ВПЛИВ ПЕРВИННИХ ПРОДУКТІВ 13-ЛІПОКСИГЕНАЗНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІНОЛЕВОЇ ТА АРАХІДОНОВОЇ КИСЛОТ НА АКТИВНІСТЬ 9-ЛІПОКСИГЕНАЗИ ЗА ДІЇ МЕХАНІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ БУЛЬБ КАРТОПЛІ

В останні роки інтенсивно досліджуються механізми взаємодії патогенів і рослин. Сигналом, що викликає відповідь рослинної клітини, є різні за хімічною будовою еліситори, серед яких полієнові жирні кислоти - арахідонова, ейкозапентаєнова та їх окисненні похідні [194-196]. Відповіддю рослинної клітини на дію патогенів та їх продуктів - еліситорів є підвищення в цитозолі вмісту іонів кальцію і протонів завдяки активації відповідних іонних каналів плазмалеми та тонопласта [195]. Певний внесок в обмін кальцієм здійснюють інтермедіати деяких сигнальних систем, здібні виступати як кальцієві іонофори. До них відносять, наприклад, гідроперокси похідні полієнових жирних кислот, що утворюються при «включенні» ліпоксигеназної сигнальної системи, та фосфатидну кислоту, яка накопичується при «включенні» фосфатидної сигнальної системи. Передбачається, що рання активація сигнальних систем клітин залежить від трансмембранної зміни концентрацій певних іонів, в той же час наступну регуляторну дію спричинюють сигнальні системи [195, 197]. Так, інтермедіати ліпоксигеназної сигнальної системи (полієнові жирні кислоти та їх гідроперокси похідні) інгібують Ca^{2+} -АТФази, в той же час H^{+} -АТФаза плазмалеми активується полієновими жирними кислотами, а також лізофосфоліпідами.

На даний час актуальним є з'ясування впливу еліситорів на функціонування ферментів ліпоксигеназного шляху окиснення поліненасичених жирних кислот [194, 197, 198] та взаємозв'язку 13- та 9-ліпоксигеназних шляхів утворення оксиліпінів [199]. Одними з

цікавих для дослідження систем є рослинні системи, що використовують для дослідження участі ліпоксигеназ та їх продуктів в умовах механічного стресу, експериментального, або біотичної природи (комахи, грибна пліснява та ін.) [172, 196]. З використанням експериментальних модельних систем, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні, цікавим було проаналізувати розподіл активностей ферментів ліпоксигеназного шляху синтезу оксиліпінів за умов обробки рослинного матеріалу екзогенним 15-гідропероксидом арахідонової кислоти (елісітор для рослинної клітини) по відношенню до контролю. Це дозволило б встановити, як впливають на функціонування ліпоксигеназної системи сполуки, що потрапляють в рослинну клітину завдяки взаємодії рослини з комахами, за умов грибкової інфекції та ін. Отже, метою досліджень було з'ясування дії 15-гідропероксиду арахідонової кислоти на функціонування ліпоксигеназ та біоконверсію 13-гідропероксиду лінолевої кислоти безклітинними екстрактами з бульб картоплі в модельних системах, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні.

Первинні продукти ліпоксигеназного окиснення поліненасичених жирних кислот - гідропероксиди задіяні щонайменше в шести ферментативних шляхах синтезу десятків окиснених ліпідних похідних (оксиліпінів), що беруть участь у метаболізмі рослин за трьома напрямками - забезпечення відповіді організму на дію несприятливих факторів зовнішнього середовища, залучення до процесів старіння клітини та апоптозу, участь у проростанні насіння рослин. В рослинній клітині первинні продукти ліпоксигеназного каталізу є субстратами реакцій, що каталізуються редуктазою, пероксигеназою, гідропероксидліазами, дівінілестеразою, аленоксидсинтазою.

В серії експериментів по дослідженню функціонування ферментів ліпоксигеназного шляху окиснення поліненасичених жирних кислот в модельних системах, що імітують функціонування рослинної клітини при механічному ушкодженні, з використанням дисків з бульб картоплі встановлено значне підвищення активності ліпоксигенази та швидкості біоконверсії 13-гідропероксиду лінолевої кислоти на четвертій годині дії стресового фактору (рис. 3.11.).

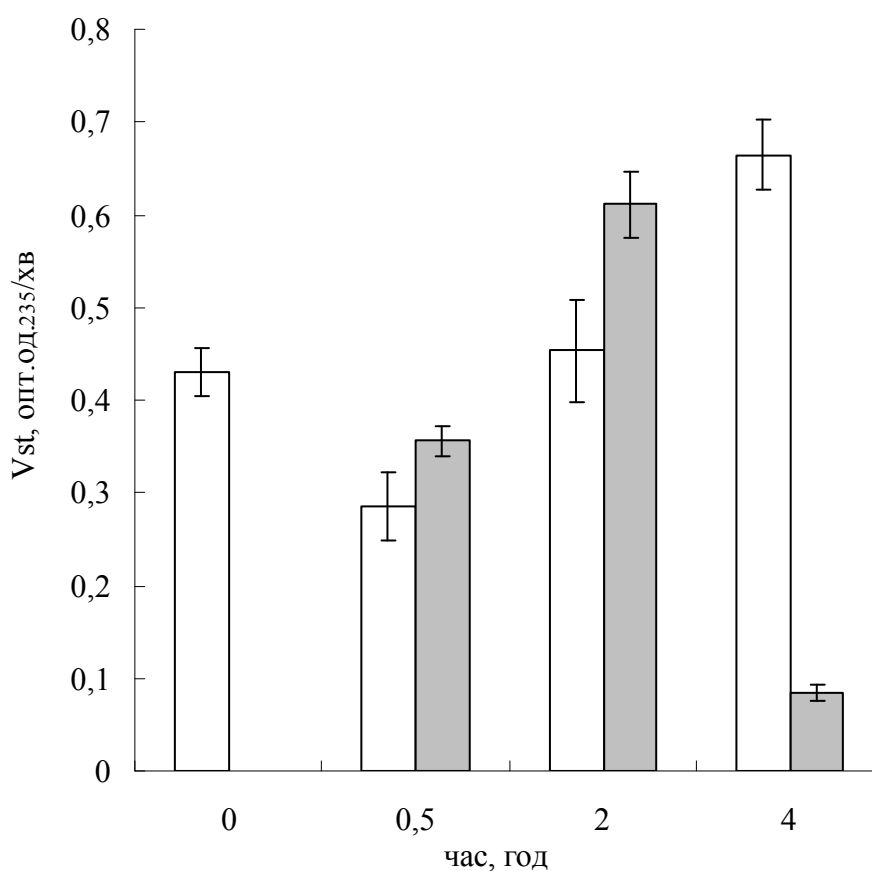


Рис. 3.11. Активність 9-ліпоксигенази за дії 1 мкМ 15-гідропероксиду арахідонової кислоти в моделях механічного ушкодження бульб картоплі

Внесення екзогенного 15-гідропероксиду арахідонової кислоти (1 мкМ) в середовище інкубації дисків з бульб картоплі сприяло підвищенню активності ліпоксигенази протягом 0,5 та 2 год з різким зниженням на 4 год дії стресового фактору, швидкість біотрансформації 13-гідропероксиду лінолевої кислоти ферментними препаратами знижувалась в усіх досліджених часових інтервалах (рис 3.12).

Аналогічні результати були отримані при введенні в середу для інкубування 1 мкМ 13-гідропероксиду лінолевої кислоти (рис.3.13.). Підвищення активності фосфоліпази Д та ліпоксигенази при дії механічного ушкодження на плоди огірка в порівнянні з контролем як результат стимулювання іонами Ca^{2+} , показано в роботі [197].

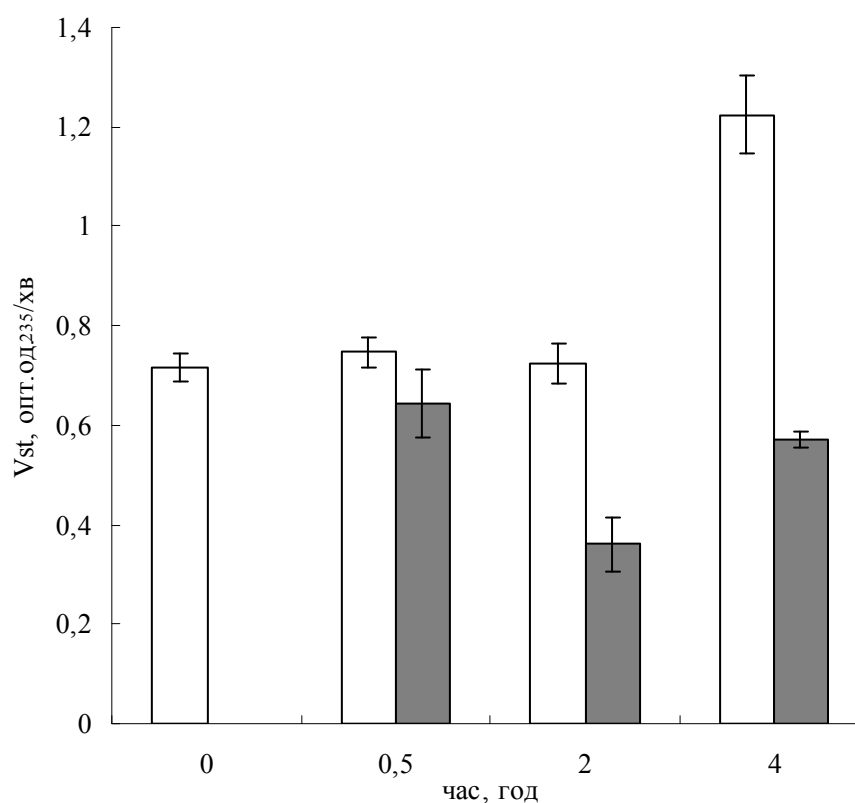


Рис. 3.12. Швидкість біоконверсії гідропероксидів полієнових жирних кислот за дії 1 мкМ 15-гідропероксиду арахідонової кислоти в моделях механічного ушкодження бульб картоплі

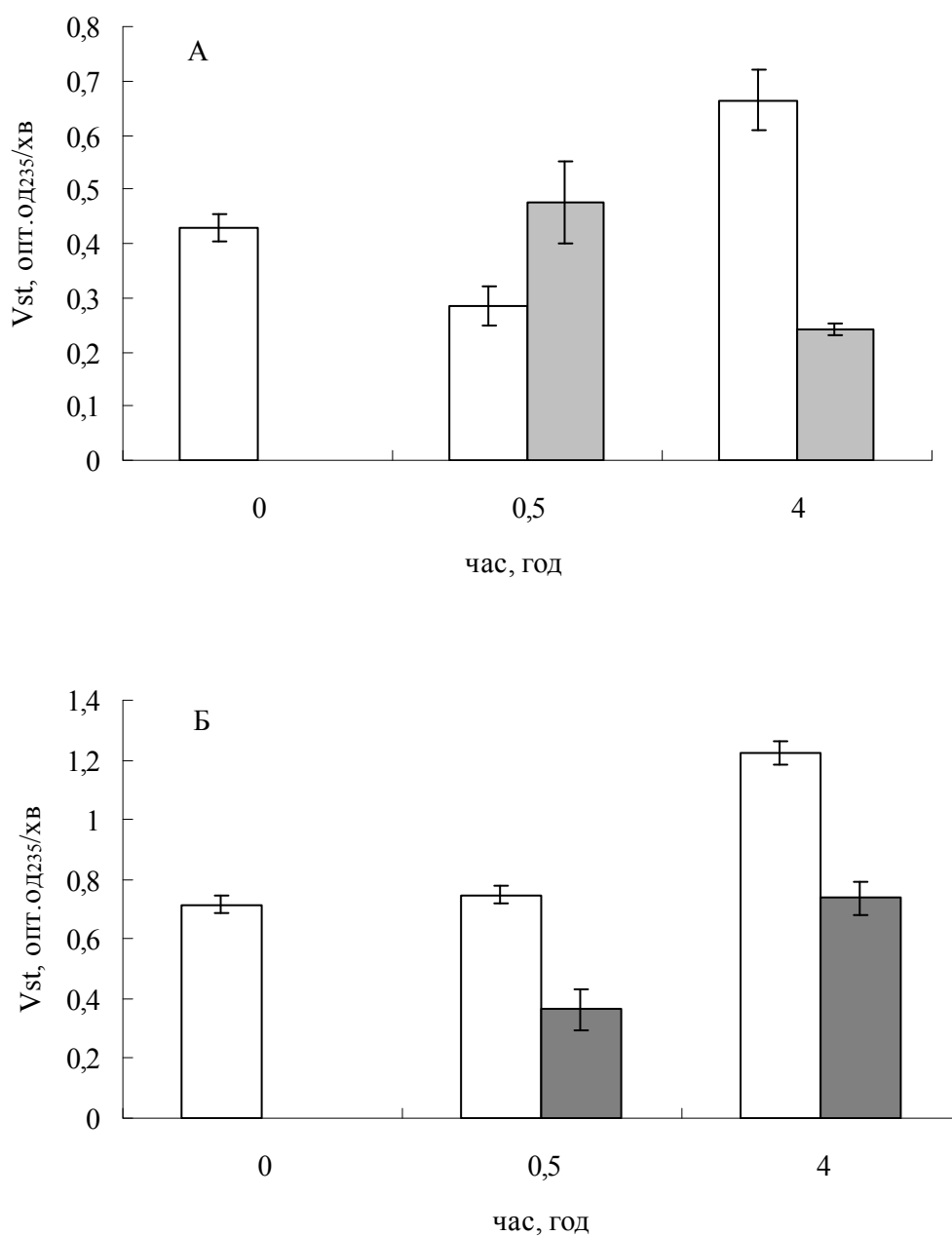


Рис. 3.13. – Вплив 1 мкМ 13-гідропероксиду лінолевої кислоти на активність 9-ліпоксигенази (А) та швидкість розпаду 13-гідропероксиду лінолевої кислоти (Б) в експериментальних системах механічного ушкодження бульб картоплі

Результати впливу фосфатидної кислоти на біоконверсію 13-гідропероксиду лінолевої кислоти, навпаки, виявили здатність

фосфатидної кислоти в концентрації 10 мкМ знижувати швидкість процесу на 30 % від початкової (рис.3.14). Таким чином, дія фосфатидної кислоти може бути реалізована не тільки на рівні ключових ферментів ліпоксигеназного каскаду - ліпоксигеназ, а і на подальших стадіях ферментативного перетворення первинних ліпоксигеназних продуктів. Відомо, що ліпіди і ліпідні метаболіти залучені в процесах утворення захисних молекул при адаптації рослин до несприятливих умов зовнішнього середовища та механічного ушкодження [162, 200-202].

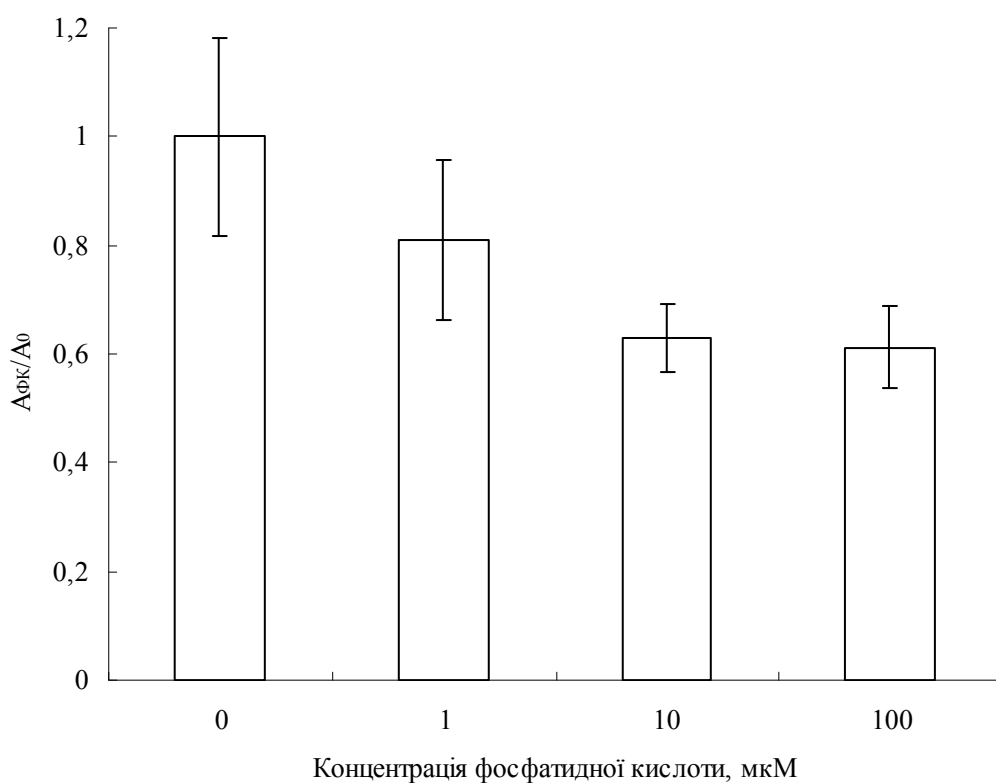


Рис. 3.14. Залежність $A_{ФК}/A_0$ від концентрації фосфатидної кислоти ($A_{ФК}$ - швидкість біоконверсії 13-гідропероксиду лінолевої кислоти в присутності фосфатидної кислоти, A_0 - швидкість біоконверсії 13-гідропероксиду лінолевої кислоти у відсутності фосфатидної кислоти).

Кількість фосфатидної кислоти в перші 5 хв після дії стресового фактору зростає приблизно вчетверо, а лізофосфатидилхоліну та лізофосфатидилетаноламіну в перші 15 хв вдвічі перевищує показник для неушкодженого листа. Ці результати свідчать про роль гідролізу фосфоліпідів і як наслідок накопичення ліпідних метаболітів в перші хвилини дії несприятливого фактору.

На рис.3.15 представлені результати вивчення впливу «маркерів» фізіологічних змін рослинної і тваринної клітин - лізофосфоліпідів різної структури на активність ліпоксигенази з бульб картоплі.

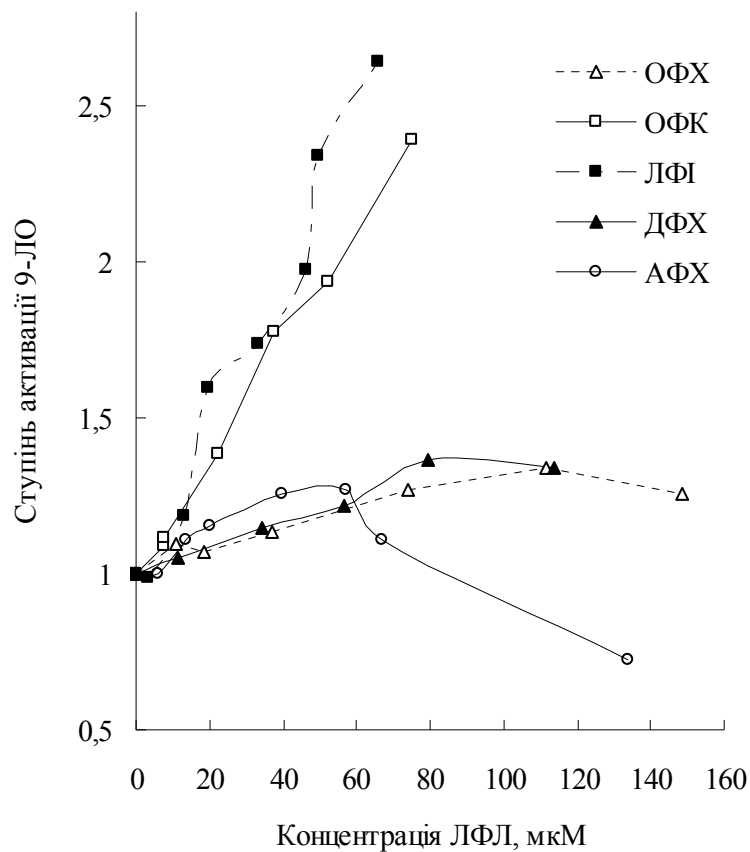


Рис. 3.15. Вплив лізофосфоліпідів на ступінь активації 9-ліпоксигенази з бульб картоплі. По осі ординат наведено ступінь зміни активності ферменту, що визначали за формулою $V_{st(LFL)} / V_{st}^0$, де $V_{st(LFL)}$ - активність ліпоксигенази в присутності лізофосфоліпідів, а V_{st}^0 - активність у відсутності ефектору

Виявилось, що лізофосфатидилхоліни (ЛФХ), в структурі яких ацильні залишки представлені олеїною (18:1) (ОФХ), арахідоною (20:5) (АФХ) та додекановою (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 ліпоксигеназної реакції. Ще більший активуючий ефект проявляють кислі ліпіди - лізофосфатидилінозит (ЛФІ) та лізофосфатидна кислота (ОФК), ацильний залишок якої був представлений олеїною кислотою. ЛФІ в концентрації 50 мкМ змінює форму субстратної залежності активності ферменту (рис. 3.16). Обрахунки залежностей стаціонарної швидкості окиснення лінолевої кислоти від концентрації субстрату у відповідності до рівняння Хіла в присутності та у відсутності ЛФІ представлені в табл. 3.1 та вказують на алостеричний механізм дії активатора. Отримані нами результати та літературні дані свідчать про можливість залучення таких потужних біологічно-активних сполук як ЛФЛ та фосфатидна кислота до регуляції ліпоксигеназного ферментативного каскаду.

Таблиця 3.1

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

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

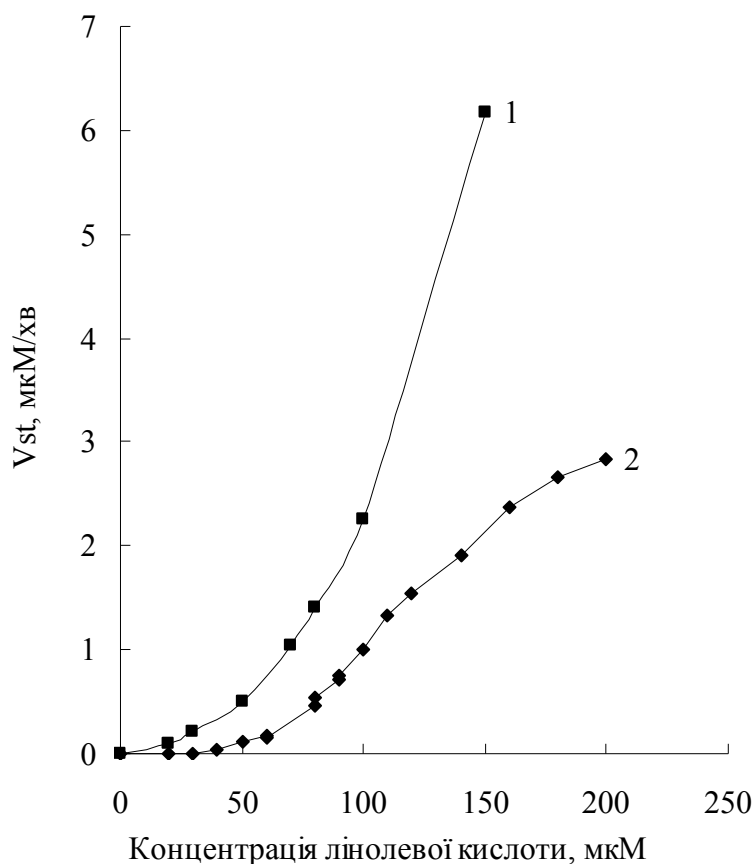


Рис. 3.16. Залежність активності 9-ліпоксигенази з бульб картоплі від концентрації субстрату - лінолевої кислоти в присутності (1) та у відсутності лізофосфатидилінозиту (2).

Таким чином, встановлено, що екзогенний 15-гідропероксид арахідонової кислоти на фоні адаптації рослинної клітини до механічного ушкодження на ранніх етапах (0,5 та 2 год) стимулює активність ліпоксигеназ, паралельно зменшуючи швидкість розщеплення 13-гідропероксиду лінолевої кислоти. Потім, через 4-години дії стресового чинника, ефект дослідженої сполуки на ліпоксигеназу змінюється на протилежний, і спостерігається суттєве зниження активності як ліпоксигеназ, так і ферментів деградації первинних ліпоксигеназних

продуктів. Передбачається, що однією з причин коливання активностей ферментів може бути пряма взаємодія з продуктами реакцій, що каталізуються фосфоліпазами D та A2 - фосфатидною кислотою та лізофосфоліпідами, що вказує на зв'язок цих сигнальних шляхів рослинної клітини при адаптації до несприятливих факторів зовнішнього середовища.

3.4 КАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОПЕРОКСИДЛІАЗИ З ПРОРОСТКІВ КАРТОПЛІ

Фітооксиліпіни - біологічно активні речовини рослин, синтезовані за участю ферментів ліпоксигеназного шляху окиснення поліненасичених жирних кислот [186]. Однією з ланок ліпоксигеназної сигнальної системи є гідропероксидліази (ЕС: 4.1.2.-) - ферменти, що каталізують перетворення первинних продуктів ліпоксигеназних реакцій: 9-гідропероксилінолевої та 9-гідропероксиліноленової кислот у C_9 -альдегиди та C_9 -альдокислоти, та 13-гідропероксилінолевої та 13-гідропероксиліноленової кислот в C_6 -альдегиди та C_{12} -альдокислоти [203]. Продукти гідропероксидліазних реакцій швидше, ніж жасмонова кислота, накопичуються при ушкодженні, створюючи хімічний захисний бар'єр для проникнення інфекції. Данні щодо фізіологічної дії гідропероксидліазних метаболітів 9-ліпоксигеназного шляху утворення оксиліпінів - C_9 -альдегідів та C_9 -альдокислот та подальші їх перетворення на відміну від біологічної активності C_6 -альдегідів та C_{12} -альдокислот на даний час практично відсутні. Вважають, що деякі з ліпоксигеназних метаболітів задіяні в захисті рослини від патогенних факторів, виконуючи функції сигнальних молекул та вторинних месенджерів [72, 186]. Стимулювання 9-ліпоксигеназного шляху при біотичних стресах пов'язують з участю даного ліпоксигеназного шляху в адаптації рослинної клітини до дії стресових чинників [196, 199]. Навпаки, комахи провокують селективне пригнічення гідропероксидліазної ланки оксиліпінового шляху [198, 204]. Одними з цікавих для дослідження систем є рослинні системи, що використовують для дослідження участі ліпоксигеназ та їх продуктів в умовах механічного стресу, експериментального, або біотичної природи (комахи, грибна пліснява і т.ін.) [196]. Необхідність з'ясування

фізіологічної ролі 9-гідропероксидліазних метаболітів в умовах адаптації рослинної клітини до дії стресових чинників обумовлює інтерес до отримання цих сполук в полупрепаративних кількостях ферментативно з використанням 9-гідропероксидліаз для подальшого дослідження їх впливу на функціонування рослинної клітини. Встановлено, що серед продуктів трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти безклітинними екстрактами з бульб картоплі є як 9-, так і 13-гідропероксидліазі продукти [176]. На відміну від бульб, в листі картоплі виявляють лише 13-гідропероксидліазну активність, рівень якої може змінюватись в умовах дії стресових чинників [205, 206]. З метою пошуку збагаченого гідропероксидліазною активністю джерела для отримання ферменту, що буде використаний в розробці способів ферментативного синтезу 9-гідропероксидліазних метаболітів, необхідно було провести порівняльне дослідження активності ферменту в бульбах та проростках картоплі за умов її зберігання, визначити оптимальні умови та кінетичні характеристики гідропероксидліазної реакції трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти. З огляду на те, що гідропероксидліази є мембраноасоційованими ферментами, цікавим було встановити вплив фосфатидної кислоти як ліпідного компонента мембран живої клітини на протікання гідропероксидліазної реакції. Основним ліпоксигеназним метаболітом в бульбах картоплі є 9(S)-гідропероксид лінолевої кислоти [207], кількість якого значно зростає між 45 і 60 днями зберігання бульб картоплі (стадія ініціації проростання). В серії експериментів по вивченню гідропероксидліазної активності за умов зберігання бульб картоплі встановлено, що на стадії ініціації проростання (45-60 днів) в проростках спостерігається максимальна активність гідропероксидліаз. На стадії апікального домінування (15-45 днів) активність ферменту практично відсутня, в той

же час на стадії донькових бульб (210 днів) спостерігається зменшення активності в 2-3 рази порівняно з активністю на стадії ініціації проростання. Такі коливання активності ферменту можуть бути свідченням його участі в процесах активних метаболічних змін, що забезпечують перехід рослинної клітини із стану спокою в функціонально-активний стан, і пов'язані як з міграцією і розпадом ліпідів, так і з утилізацією їх за участю ліпоксигеназ та гідропероксидліаз.

Було досліджено вплив на протікання гідропероксидліазної реакції рН реакційного середовища. Залежності стаціонарної швидкості гідропероксидліазної реакції розщеплення 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти від рН реакційного середовища представлені на рис.3.17.

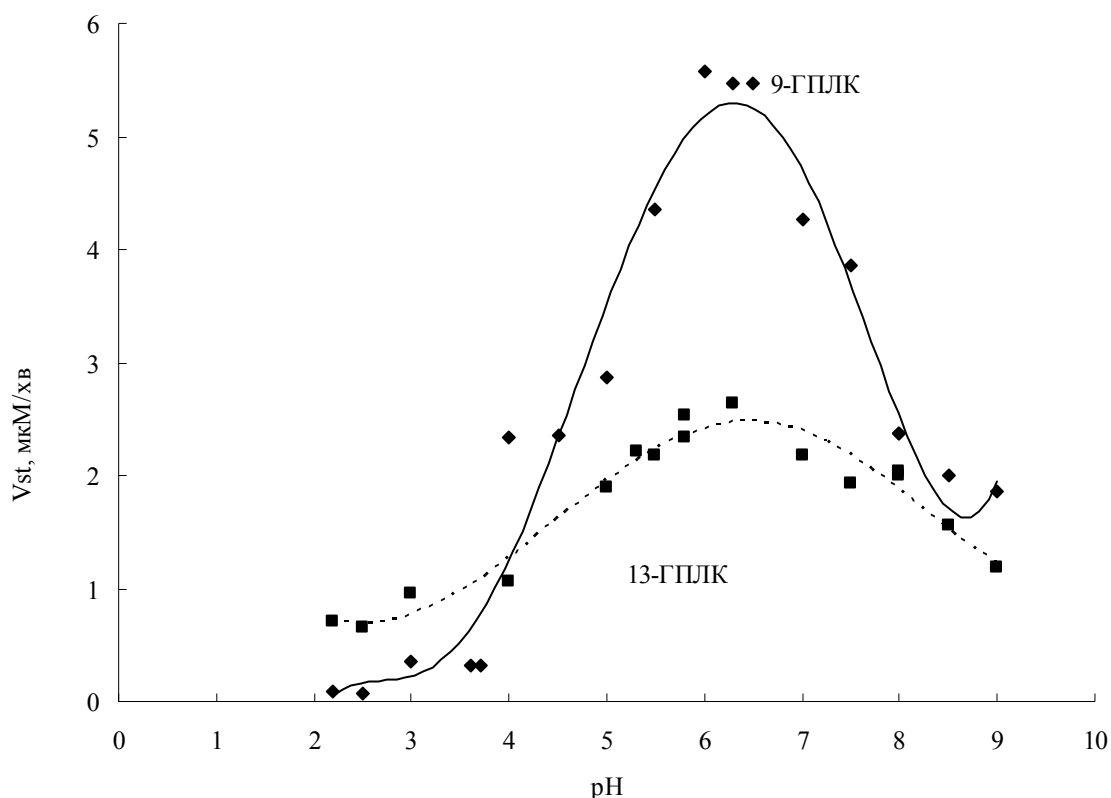


Рис. 3.17. Залежність активності гідропероксидліази від рН реакційного середовища

Дзвоноподібна форма кривих вказує на участь в реакції двох іоногенних груп ферменту з уявними значеннями pK , які наведені в табл.3.2.

Таблиця 3.2

Значення pK_1 , pK_2 , V_{opt} для гідропероксидліази з проростків картоплі

Значення параметру	Субстрат гідропероксидліази	
	9-гідропероксид лінолевої кислоти	13-гідропероксид лінолевої кислоти
pK_1	$8,03 \pm 0,14$	$8,51 \pm 0,13$
pK_2	$4,61 \pm 0,16$	$4,49 \pm 0,18$
V_{opt} , мкМ/хв	$5,27 \pm 0,36$	$1,80 \pm 0,11$
c , мкМ/хв	-	$0,61 \pm 0,10$

Розрахунок проведено у відповідності з (f) рН -функцією

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

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.

Встановлені оптимальні для протікання гідропероксидліазної реакції трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти значення рН відповідно дорівнюють 6,3 та 6,5.

На рис. 3.18 представлені залежності гідропероксидліазної активності від концентрації субстратів - 13- та 9-гідропероксидів лінолевої кислоти в реакційних сумішах, що містили: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3 та 6,5 відповідно для 9- та 13-

гідропероксидів лінолевої кислоти), 0,02% Lubrol PX, 10-70 мкМ гідропероксиди лінолевої кислоти.

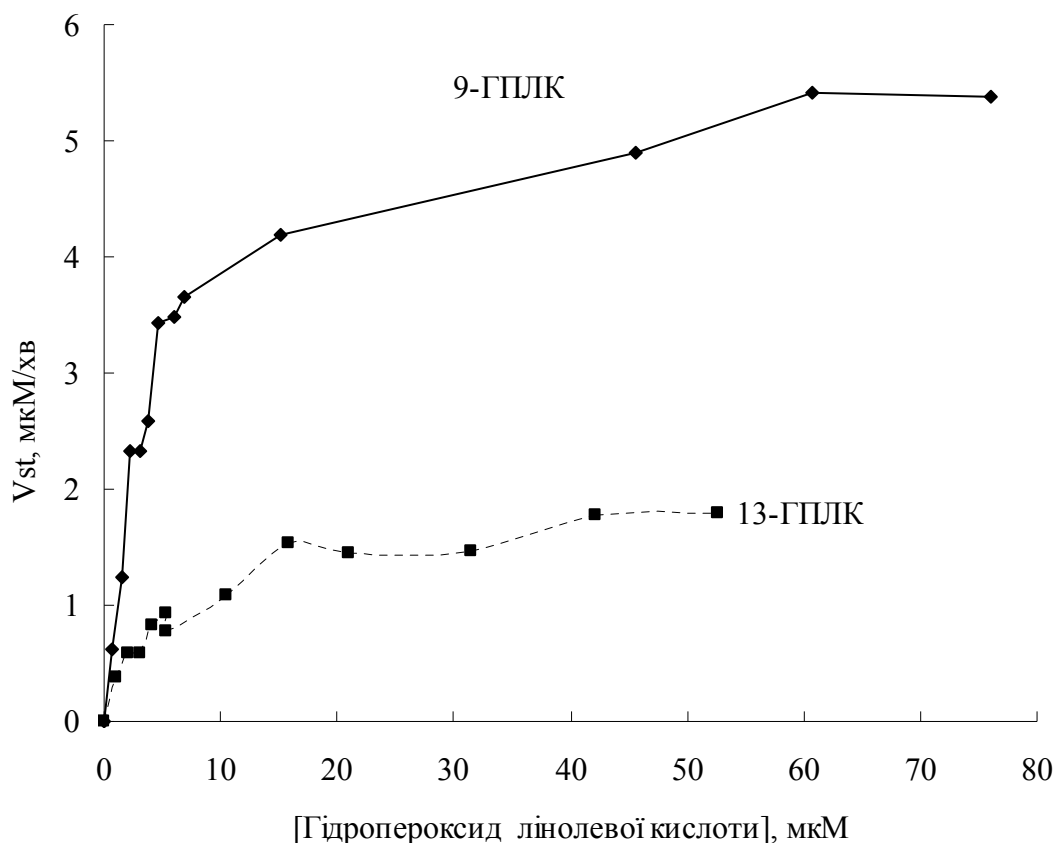


Рис. 3.18. Залежності активності гідропероксидліази від кількості субстрату - 9-гідропероксиду лінолевої кислоти (9-ГПЛК) та 13-гідропероксиду лінолевої кислоти (13-ГПЛК)

Результати розрахунку уявних констант Міхаеліса (K_m) та максимальної швидкості реакції (V_{max}) у відповідності до рівняння Міхаеліса-Ментен представлені в табл. 3.3. Порівняння отриманих нами кінетичних параметрів гідропероксидліазної реакції гідролізу 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти узгоджуються з літературними

даними для гідропероксидліази з проростків гороху та листя *Solanum tuberosum* [208, 209]. Так, значення уявних K_m у випадку 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти в реакціях, що каталізувались гідропероксидліазою з проростків гороху становили відповідно 4,5 та 11,1 мкМ [208].

Таблиця 3.3

Кінетичні характеристики гідропероксидліази з проростків картоплі

Кінетичний параметр	Субстрат гідропероксидліазної реакції	
	9- гідропероксид лінолевої кислоти	13- гідропероксид лінолевої кислоти
K_m , мкМ	3,92±0,38	6,31 ±0,89
V_{max} , мкМ/хв	5,54±0,16	1,94±0,08

Даних щодо регуляторів активності гідропероксидліаз в літературі на даний час небагато. Так, відомо, що хлорид калію значно стабілізує гідропероксидліазу в екстракті з листя м'яти [210], високоочищена гідропероксидліаза з листя амаранту чутлива до дії нордигідрогуарамової кислоти, 2(Е)-гексеналю та $HgCl_2$ [211] та переважно трансформує 13-гідропероксид ліноленової кислоти з K_m 62,7 мкМ. Встановлено, що 2(Е)-гексеналь суттєво інгібує гідропероксидліазу амаранту та проявляє комплексну дію при взаємодії рослина-патоген, відновлюючи стійкість рослини до патогенної інфекції. На високу специфічність до субстратів реакції, притаманну гідропероксидліазі, вказує встановлений нами факт неможливості гідролізу 9-гідропероксиду лінолевого спирту в присутності ферменту, що свідчить про необхідність для протікання гідропероксидліазного каталізу наявності в структурі субстрату карбоксильної групи.

Цікавою виявилась здібність 9-гідропероксиду лінолевого спирту суттєво блокувати протікання реакції гідропероксидліазного перетворення гідропероксидів поліненасичених жирних кислот за умов попередньої інкубації з ферментом (рис. 3.19). 9-гідропероксид лінолевого спирту зменшував стаціонарну швидкість гідропероксидліазної реакції вдвічі в концентрації 20 мкМ.

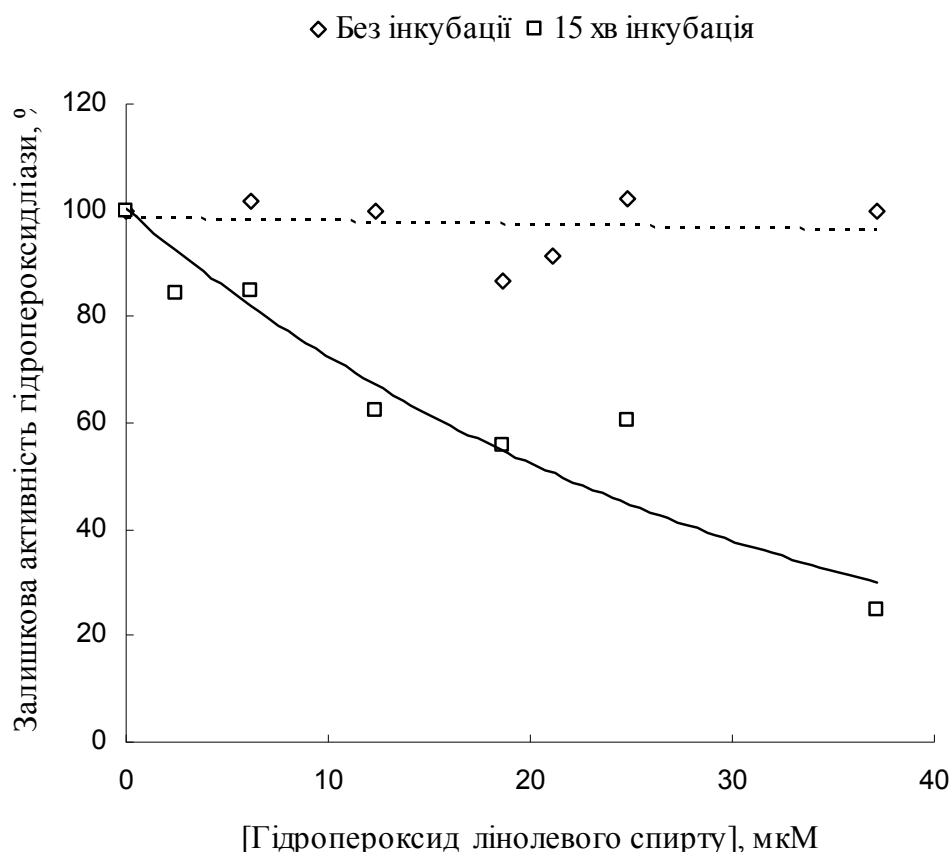


Рис. 3.19. Вплив 9-гідропероксиду лінолевого спирту на активність гідропероксидліази

Фосфоліпіди – основні структурні компоненти мембрани, вони можуть бути кофакторами для мембранних ферментів, сигнальними попередниками або сигнальними молекулами; зв'язуюючись з білками, фосфоліпіди можуть прямо викликати їх конформаційні зміни [212]. Фосфоліпіди здатні активувати (фосфатидна кислота, фосфатидилінозит,

фосфатидилсерин) та інгібувати (фосфатидилхолін) перебіг ліпоксигеназного каталізу [152, 213]. Фосфатидна кислота у малих кількостях входить до складу біомембрани клітини і є продуктом дії ферментів фосфоліпази С та фосфоліпази D, виступаючи у клітинному матриксі як вторинний мессенджер [212], крім того фосфоліпази забезпечують ЛО субстратом - вільною жирною кислотою [144].

Вперше було досліджено вплив фосфатидної кислоти як сполуки, що входить до мембран живої клітини, на мембраноасоційований фермент - гідропероксидліази. Додавання в стандартну реакційну суміш фосфатидної кислоти в концентраціях 10-50 мкМ призводило до зменшення активності гідропероксидліази (рис. 3.20).

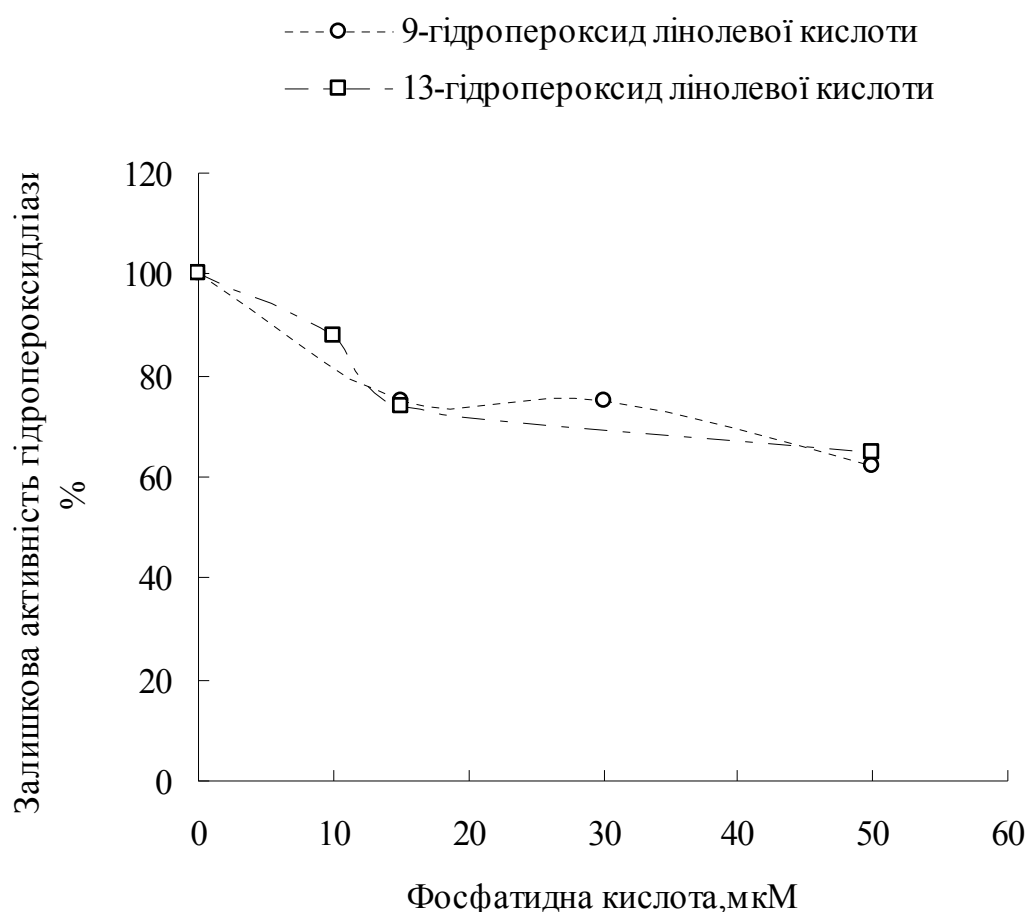


Рис. 3.20 - Вплив фосфатидної кислоти на активність гідропероксидліази

Отже, фосфатидна кислота здатна інгібувати активність гідропероксидліази, і, таким чином, забезпечувати підтримання необхідного для клітини рівня ліпоксигеназних метаболітів. Необхідно відмітити, що дія фосфатидної кислоти на ключовий фермент ліпоксигеназного шляху утворення оксиліпінів є протилежною, а саме, в присутності фосфатидної кислоти істотно збільшується активність ліпоксигенази з бульб картоплі [155]. Проведені дослідження дозволяють стверджувати, що одним з перспективних для отримання ферменту джерел є проростки картоплі. Вперше, з проростків картоплі виділена та очищена гідропероксидліаза, що проявляє активність як по відношенню до 9-гідропероксиду лінолевої кислоти, так і до 13-гідропероксиду лінолевої кислоти, визначені кінетичні параметри гідропероксидліазної реакції, знайдені нові інгібітори ферменту - 9-гідропероксид лінолевого спирту та фосфатидна кислота. Отримані нами результати розширюють сучасні уявлення щодо участі фосфатидної кислоти в регуляції гідропероксидліазної ланки ліпоксигеназного шляху утворення оксиліпінів, а також можуть бути використанні при розробці способів ферментативного синтезу 9- та 13-гідропероксидліазних метаболітів з метою дослідження їх біологічної активності.

3.5 ВПЛИВ БРАССИНОСТЕРОЇДІВ НА АКТИВНІСТЬ 9-ЛІПОКСИГЕНАЗИ З БУЛЬБ КАРТОПЛІ В МІЦЕЛЯРНИХ СИСТЕМАХ *IN VITRO*

На даний час відомо, що ферменти, які функціонують у складі біомембран знаходяться у вигляді складних надмолекулярних утворень з особливими властивостями, відмінними від тих, що реалізуються в гомогенних водних розчинах. В організмах тварин та людини мембранні ферменти є основною мішенню дії лікарських препаратів, тому вивчення їх взаємодії з біологічно активними сполуками (інгібування, активація) саме у системах змінного складу, що моделюють біологічні мембрани живих клітин, є необхідною умовою для розуміння механізмів дії біорегуляторів, побудови математичних та хімічних моделей їх дії, що мають прогнозуючу силу.

Сучасним напрямком досліджень є пошук можливих шляхів цілеспрямованого фармакологічного впливу на ліпоксигенази при патологічних станах, що супроводжуються гіперпродукцією ліпоксигеназних метаболітів (інфаркт міокарду, бронхіальна астма, псоріаз). Відомими на даний час інгібіторами ліпоксигеназ є як природні сполуки – гідрокси- та гідроперокси- похідні арахідонової кислоти, флавоноїди, вітамін Е, так і синтетичні, серед яких синтетично модифіковані природні сполуки. Дослідження взаємодії ліпоксигеназ з синтетично модифікованими природними субстратами важливо для розуміння особливостей функціонування цих ферментів в організмі та пошуку відповідних шляхів регуляції їх активності. Необхідно відмітити, що оксиліпінову сигнальну систему еукаріотичних організмів, вважають однією з найважливіших сигнальних систем клітини, оскільки простаноїди та інші ейкозаноїди підтримують гомеостаз у ссавців на клітинному рівні та на рівні організму в цілому

(контроль життєво важливих функцій – скорочення гладкої мускулатури, діяльність серцево-судинної, травної та дихальної систем, запальні процеси, алергічні реакції).

Одним з перспективних напрямків також є дослідження оксиліпінової сигнальної системи та її ролі в процесах росту та розвитку рослин. Вивчення оксиліпінового сигнального метаболізму рослин виявило участь оксиліпінів у рості та розвитку рослин, у формуванні стійкості до патогенів та адаптації до дії несприятливих факторів. Цікавим є те, що за сучасними даними метаболізм оксиліпінів ссавців та рослин має як схожі, так і відмінні риси.

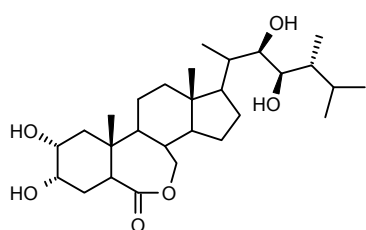
Основна мета досліджень - вивчення впливу нового класу біорегуляторів стероїдної природи рослинного походження - брассиностероїдів на каталітичні властивості ліпоксигеназ (лінолеат:кисень оксидоредуктази, КФ 1.13.11.-, ЛО).

Актуальність роботи визначається необхідністю пошуку ефективних та нетоксичних засобів цілеспрямованого впливу на ліпоксигенази у випадках протікання патологічних процесів в організмах людини та тварин, що супроводжуються змінами базового рівня лейкотриєнів та ліпоксинів.

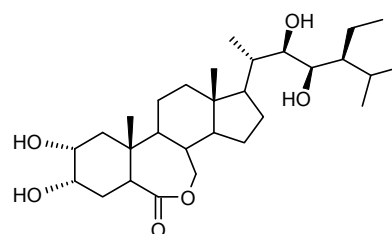
З гіперпродукцією ліпоксигеназних метаболітів пов'язують прояв симптомів таких захворювань як бронхіальна астма, алергічний риніт, інфаркт міокарду, атеросклероз, злоякісні пухлини та ін., а терапія цих станів потребує застосування інгібіторів ліпоксигеназного каталізу. Ефективні, а бажано і селективні інгібітори ліпоксигеназ, на основі природних сполук та їх синтетичних похідних, можуть бути використані в майбутньому як компоненти терапевтичних схем лікування цих захворювань.

Об'єкти дослідження - 9-ліпоксигеназа з бульб картоплі (арахідонат 5-ліпоксигеназа, лінолеат 9-ліпоксигеназа, 9-ЛО) -

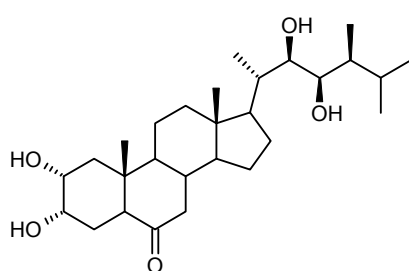
відповідно як модель 5-ліпоксигенази людини, і природні brassinosteroids та їх синтетичні похідні, що синтезовані у відділі Хімії стероїдів ІБОХ НАН Білорусі під керівництвом академіка Хрїпача В.О. Структурні формули природних brassinosteroids представлено на рис. 3.21. Синтетичні похідні природних brassinosteroids наведені на рис.3.22.



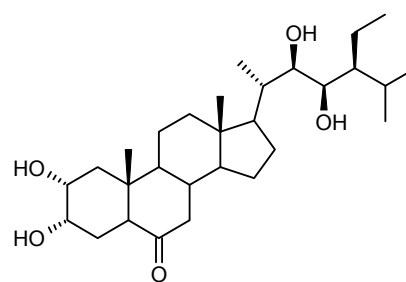
24-епібрасинолід



28-гомобрасинолід



кастастерон



гомокастастерон

Рис. 3.21. Природні brassinosteroids

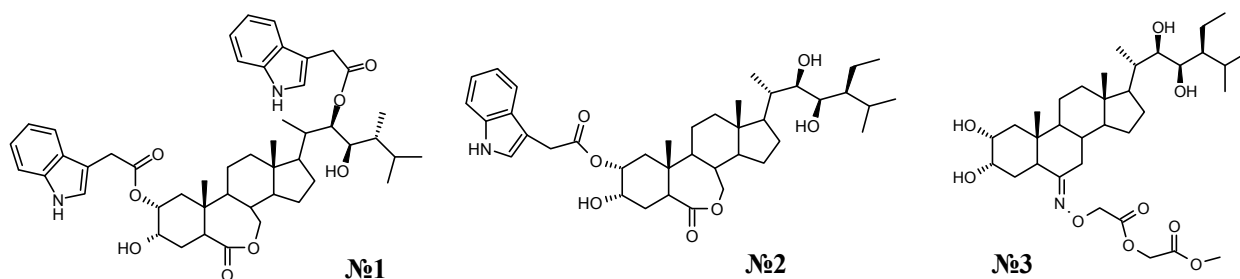


Рис. 3.22 - Синтетичні похідні брасиностероїдів:

сполука №1 - *22R,23R,24R*)-3α,23-дигідрокси-2α,22-ди-(3'-індолілацетокси)-24-метил-В-гомо-7-окса-5α-холестан-6-он,
 сполука №2 - *(22R,23R,24S)*-3α,22,23-тригідрокси-2α-(3'-індолілацетокси)-В-гомо-7-окса-24-етил-5α-холест-6-он),
 сполука №3 - *етилівий естер* {*((22R,23R,24R)*-2α,3α,22,23-тетрагідрокси-24-метил-5α-холест-6-іліденаміно)окси}оцтової кислоти.

З літературних джерел відомо, що 24-епібрасинолід здатен знижувати рівень холестерину в крові [11], є дані про використанні цієї сполуки в антивірусній терапії [12], похідні брасиностероїдів суттєво змінюють активність монооксигеназ мікросом печінки [10]. Деякі з рослинних ліпоксигеназ, зокрема 9-ліпоксигеназа з бульб картоплі, яка має структурно-функціональну подібність до 5- ліпоксигенази людини, використовують для первинного скринінгу інгібіторів ліпоксигеназ [21].

На даний час рослинні гормони та їх похідні досліджуються як потенціальні лікарські засоби. Так встановлено антиоксидантну активність синтетичних аналогів цитокінінів як нових ліпоксигеназних інгібіторів, інгібуючий вплив на монооксигеназну активність мікросом печінки ссавців похідних брасиностероїдів, антиканцерогенну та

антипроліферативну активність природних brassinosteroidів, антиСНІД-активність 24-епібрасинолідів.

В Інституті біоорганічної хімії НАН Біларусі (керівник робіт академік НАН Білорусі В.О.Хріпач) синтезовані як природні brassinosteroidи, так і похідні, що містять додаткову активну складову у вигляді залишка індоліл-3-оцтової кислоти (гетероауксину) і нові 6-оксимінопохідні 28-гомокастастерону.

На рис. 3.23 представлено залежність залишкової активності 9-ліпоксигенази з бульб картоплі від концентрації 24-епібрасинолідів. Було встановлено, що дана сполука є інгібітором 9-ліпоксигенази.

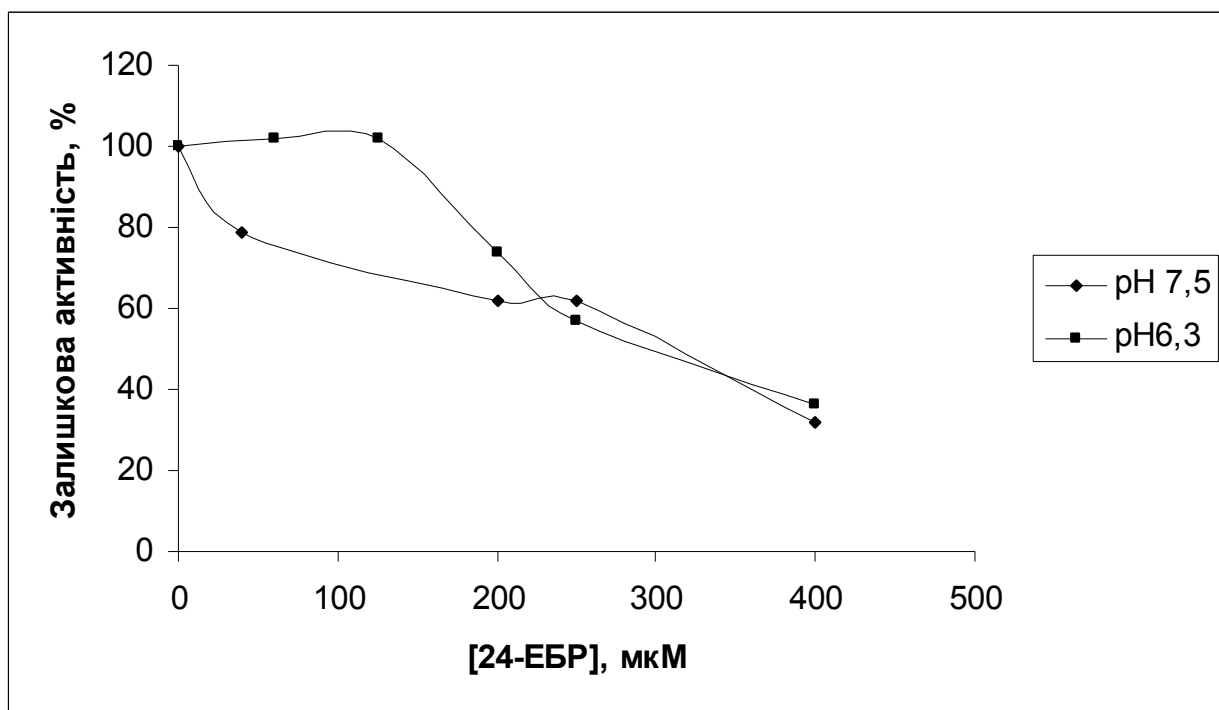


Рис. 3.23 - Вплив 24-епібрасинолідів на активність 9-ліпоксигенази

На рис.3.24 та 3.25 представлені залежності залишкової активності 9-ліпоксигенази від концентрації епікастастерону та гомокастастерону. Встановлено, що найбільший інгібуєчий ефект на ліпоксигеназу мають

24-епібрасинолід та епікастастерон, а гомобрасинолід, гомокастастерон майже не впливають на ліпоксигеназну активність.

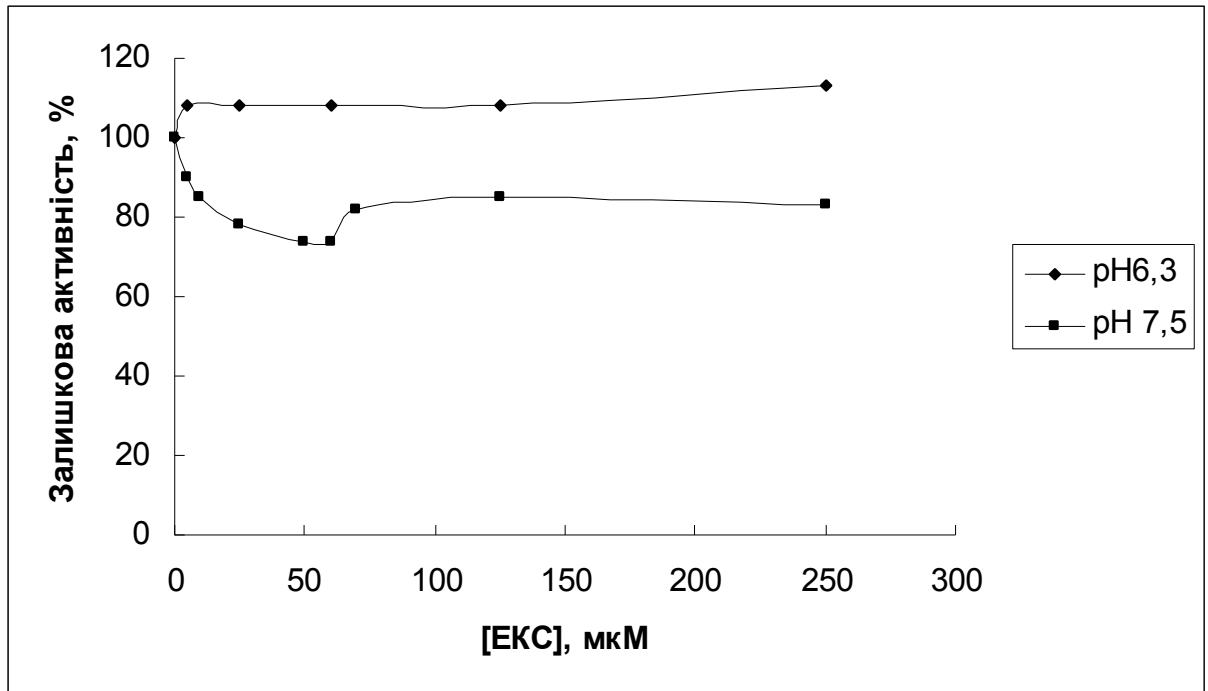


Рис.3.24 - Вплив епікастастерону на активність 9-ліпоксигенази

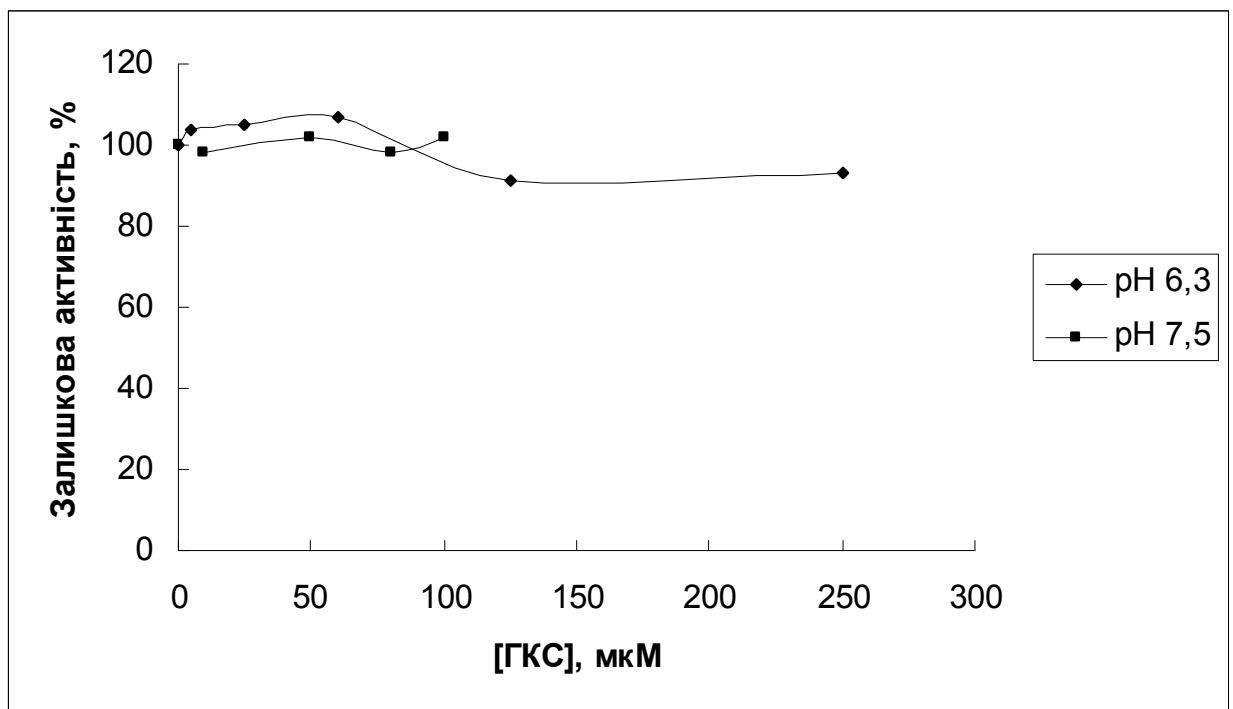


Рис. 3.25 - Вплив гомокастастерону на активність 9-ліпоксигенази

Натомість сполука № 1, що містить додаткову активну складову у вигляді залишку гетероауксину, є ефективнішою, ніж природний біорегулятор, майже в 10 разів (рис. 3.26) - IC_{50} для сполуки №1 становить 25 мкМ, в той час як для 24-епібрассинолідів - 250 мкМ.

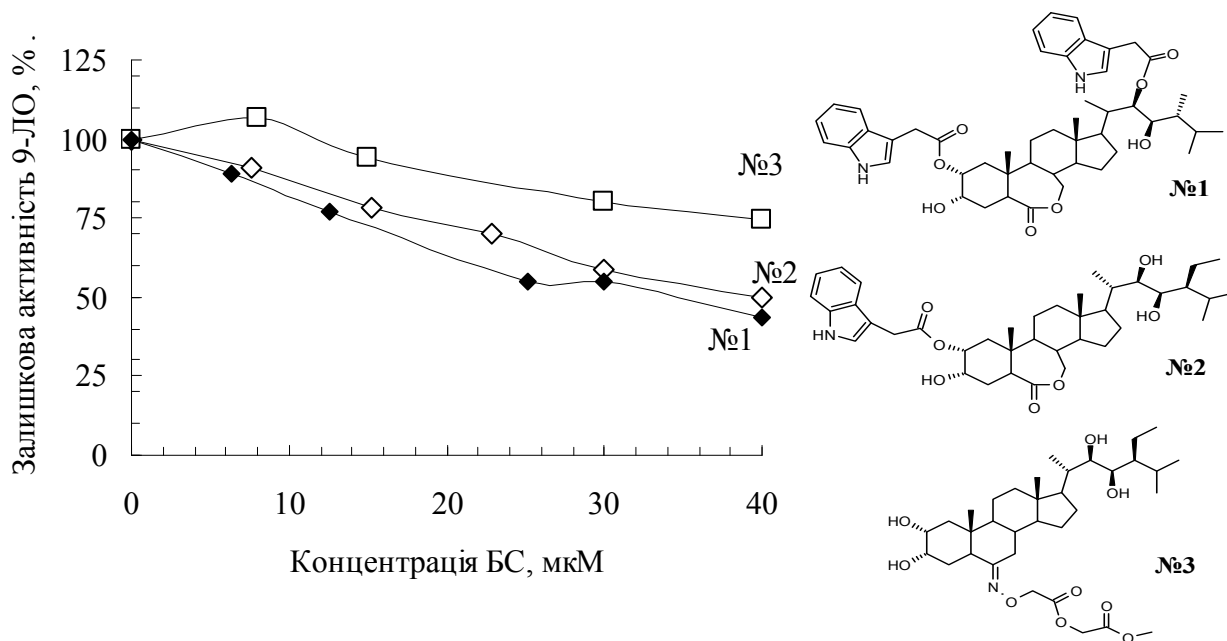


Рис. 3.26. Вплив синтетичних похідних брассиностероїдів на активність 9-ліпоксигенази:

сполука №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,

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

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

28- гомобрассинолід в концентраціях до 140 мкМ не впливає на активність ліпоксигеназ, модифікація цього брассиностероїду залишками гетероауксину значно підвищує інгібуючу активність

сполуки № 2 по відношенню до ферменту (IC_{50} дорівнює 36 мкМ). Вплив сполуки №3 менше виражений ніж для сполуки №2, але теж суттєвий - $IC_{50} > 40$ мкМ.

Натомість гетероауксин в діапазоні концентрацій 400-1000 мкМ знижує активність ЛО не більше ніж на 10 % (рис. 3.27). Отримані нами результати вказують на можливість залучення синтетично модифікованих сполук рослинного походження - брассиностероїдів та гетероауксину до регуляції ліпоксигеназного ферментативного каскаду рослин та, з іншого боку, можуть бути потенційними лікарськими засобами для корекції рівня ліпоксигеназних метаболітів при патологічних станах організму людини.

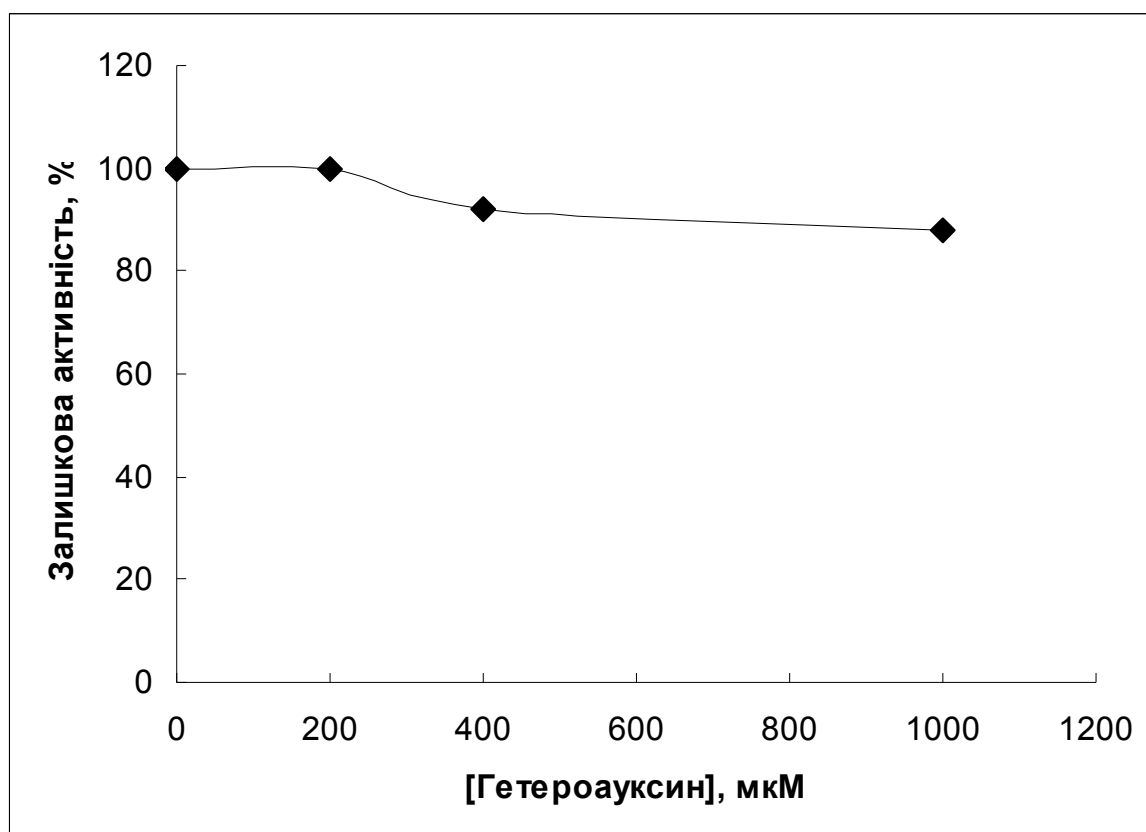


Рис. 3.27- Залежність залишкової активності ліпоксигенази від концентрації гетероауксину

На даний час молекулярні механізми участі ліпоксигеназ в процесах розвитку та стійкості до стресів рослин остаточно не з'ясовані. Дослідження особливостей механізмів функціонування рослинних ліпоксигеназ із застосуванням сполук, які впливають на активність цих ферментів, може бути інструментом в дослідженні шляхів регуляції рівня деяких рослинних гормонів, зокрема, жасмонової кислоти. Це розширило б в значній мірі існуючі уявлення про участь ліпоксигеназ в процесах росту, розвитку та старіння рослинної клітини.

З іншого боку особливу увагу привертає медичний аспект застосування отриманих в процесі вивчення структури, механізмів дії та регуляції ліпоксигеназ результатів, оскільки зміни рівня ліпоксигеназних метаболітів в організмі людини сприяють розвитку багатьох патологічних процесів, серед яких атеросклероз, алергії, запалення, інфаркт міокарду, канцерогенез. Але, незважаючи на широке коло сполук, що здатні досить ефективно впливати на активність цих ферментів, у терапевтичній практиці вони на даний час використовуються рідко.

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-епібрасинолідру на 9-ліпоксигеназу та 13-ліпоксигеназу в проростках кукурудзи *in vivo*. Встановлено, що в умовах холодного стресу стимулюючий ефект 24-епібрасинолідру 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Grechkin A.N The lipoxygenase signaling system / A. N. Grechkin, I. A. Tarchevsky // Russian Journal of Plant Physiology. – 1999. – Vol.46. – №1. – P. 114-123.
2. Joo Y.-C. Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds / Y.-C. Joo, D.-K. Oh // Biotechnology Advances. – 2012. – Vol.30. – №6. – P. 1524-1532.
3. Feussner I. The lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // Annual Review of Plant Biology. – 2002. – Vol.53. – P. 275-297.
4. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade / T. Vellosillo, M. Martínez, M. A. López [et al.] // Plant Cell. – 2007. – Vol.19. – №3. – P. 831-846.
5. Porta H. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features / H. Porta, M. Rocha-Sosa // Plant Physiology. – 2002. – Vol.130. – №1. – P. 15-21.
6. 9-lipoxygenase-derived oxylipins activate brassinosteroid signaling to promote cell wall-based defense and limit pathogen infection / R. Marcos, Y. Izquierdo, T. Vellosillo [et al.] // Plant Physiology. – 2015. – Vol.169. – №3. – P. 2324-2334.
7. Babenko L. Jasmonic acid: role in biotechnology and the regulation of plants biochemical processes / L. Babenko, I. Kosakivska, T. Skaterna // Biotechnologia Acta. – 2015. – Vol.8. – №2. – P. 36-51.
8. The contribution of lipoxygenase metabolism in the brassinosteroid signaling pathway / E. O. Fedina, F. G. Karimova, I. R. Chechetkin [et al.] // Doklady Akademii Nauk. – 2004. – Vol.395. – №2. – P. 266-269.
9. Ibrahim M.H. Abscisic acid induced changes in production of primary and secondary metabolites, photosynthetic capacity, antioxidant

- capability, antioxidant enzymes and lipoxygenase inhibitory activity of *Orthosiphon stamineus* benth / M. H. Ibrahim, H. Z. E. Jaafar // *Molecules*. – 2013. – Vol.18. – №7. – P. 7957-7976.
10. Sysa A.G. Effect of the structure of the brassinosteroid side chain on monooxygenase activity of liver microsomes / A. G. Sysa, P. A. Kiselev, V. N. Zhabinskiĭ, V. A. Khripach // *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. – 2010. – Vol.46. – №1. – P. 29-34.
11. United States Patent Application 20040225010 A1 United States (2004) A23L1/30; A61K31/365; (IPC1-7): A61K31/365. Method for decreasing cholesterol level in blood / Khripach V. , Altsivanovich K., Zhabinskiĭ V., Samusevich M. – № 10/710613; Pub. Date:11/11/2004; Filed Date: 07/23/2004; Assignee: MIKONIK TECHNOLOGIES, LTD, Minsk District (BY); DREBSK; COMPTECH, INC., Brooklyn, NY (US), US 2004/0225010 A1, Nov. 11, 2004. – 5 p.
12. United States Patent Application 20040253289 A1 United States (2004) A23L1/30; A61K9/00; A61K31/415; A61K45/06; (IPC1-7): A61K31/415; A01N43/52; A61K9/14; A61K9/20; A61K9/48; A61K35/78; A61K47/00. Natural plant compound with anti-HIV activity / Khripach V., Altsivanovich K., Zhabinskiĭ V., Samusevich M. – № 10/711162; Pub. Date: 12/16/2004; Filed Date: 08/28/2004; Assignee: MIKONIK TECHNOLOGIES, LTD, Minsk District (BY); DREBSK; COMPTECH, INC., Brooklyn, NY (US), US 2004/0253289 A1, Dec. 16, 2004. – 4 p.
13. Siedow J.N. Plant lipoxygenase: structure and function / J. N. Siedow // *Annual Review of Plant Biology*. – 1991. – Vol.42. – №1. – P. 145-188.
14. Molecular enzymology of lipoxygenases / I. Ivanov, D. Heydeck, K. Hofheinz [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2010. – Vol.503. – №2. – P. 161-174.

15. Liavonchanka A. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis / A. Liavonchanka, I. Feussner // *Journal of Plant Physiology*. – 2006. – Vol.163. – №3. – P. 348-357.
16. Andreou A Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism / A. Andreou, I. Feussner // *Phytochemistry*. – 2009. – Vol.70. – №13-14. – P. 1504-1510.
17. Brash A.R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate / A. R. Brash // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol.274. – №34. – P. 23679-23682.
18. Shibata D. Plant lipoxygenases / D. Shibata, B. Axelrod // *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*. – 1995. – Vol.12. – №2-3. – P. 213-228.
19. Rokach J., ed. *Leukotrienes and Lipoxygenases. Chemical, biological and clinical aspects* 1989, Elsevier. 518.
20. Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers / R. K. Hughes, S. I. West, A. R. Hornostaj [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2001. – Vol.353. – №2. – P. 345-355.
21. Homology modeling of 5-lipoxygenase and hints for better inhibitor design / P. Aparoy, R. N. Reddy, L. Guruprasad [et al.] // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2008. – Vol.22. – №9. – P. 611-619.
22. Effect of endocannabinoids on soybean lipoxygenase-1 activity / M. D. Nguyen, D. H. Nguyen, J.-M. Yoo [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. – 2013. – Vol.49. – P. 24-32.
23. Armstrong M.M. Inhibitory and mechanistic investigations of oxo-lipids with human lipoxygenase isozymes / M. M. Armstrong, G. Diaz,

- V. Kenyon, T. R. Holman // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2014. – Vol.22. – №15. – P. 4293-4297.
24. Rådmark O.P. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase / O. P. Rådmark // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2000. – Vol.161. – №2 II.
25. 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain / C. Hörnig, D. Albert, L. Fischer [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol.280. – №29. – P. 26913-26921.
26. X-ray absorption spectroscopic studies on iron in soybean lipoxygenase: a model for mammalian lipoxygenases / M. C. Feiters, H. Boelens, G. A. Veldink [et al.] // *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. – 1990. – Vol.109. – №3. – P. 133-146.
27. Glickman M.H. Lipoxygenase reaction mechanism: Demonstration that hydrogen abstraction from substrate precedes dioxygen binding during catalytic turnover / M. H. Glickman, J. P. Klinman // *Biochemistry*. – 1996. – Vol.35. – №39. – P. 12882-12892.
28. EPR investigation of the active site of recombinant human 5-Lipoxygenase: Inhibition by selenide / T. Hammarberg, S. Kuprin, O. Rådmark, A. Holmgren // *Biochemistry*. – 2001. – Vol.40. – №21. – P. 6371-6378.
29. The N-terminal β -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies / C. May, M. Höhne, P. Gnau [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – Vol.267. – №4. – P. 1100-1109.
30. Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase / S. Kulkarni, S. Das, C. D. Funk [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.277. – №15. – P. 13167-13174.

31. Structural basis or lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis / K. Schwarz, M. Walther, M. Anton [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol.276. – №1. – P. 773-779.
32. Kuhn H. On the mechanistic reasons for the dual positional specificity of the reticulocyte lipoxygenase / H. Kuhn, D. Heydeck, H. Sprecher // *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. – 1991. – Vol.1081. – №2. – P. 129-134.
33. Knapp M.J. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1 / M. J. Knapp, J. P. Klinman // *Biochemistry*. – 2003. – Vol.42. – №39. – P. 11466-11475.
34. Schewe T. 15-lipoxygenase-1: A prooxidant enzyme / T. Schewe // *Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.383. – №3-4. – P. 365-374.
35. Feussner I. Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids / I. Feussner, C. Wasternack // *Lipids*. – 1998. – Vol.100. – P. 146-152.
36. Brash A.R. Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids / A. R. Brash, C. D. Ingram, T. M. Harris // *Biochemistry*. – 1987. – Vol.26. – №17. – P. 5465-5471.
37. Kuhn H. Metabolism of polyenoic fatty acids by rabbit reticulocytes. Intracellular action of the erythroid lipoxygenase on membrane lipids / H. Kuhn, J. Belkner, R. Wiesner // *Biomedica Biochimica Acta*. – 1990. – Vol.49. – №2-3.
38. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases / J. Belkner, R. Wiesner, J. Rathman [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – Vol.213. – №1. – P. 251-261.
39. Kuhn H. Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities / H. Kuhn, J. Belkner,

- H. Suzuki, S. Yamamoto // *Journal of Lipid Research*. – 1994. – Vol.35. – №10. – P. 1749-1759.
40. Butovich I.A. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: Kinetics and positional, stereo, and geometrical (cis, trans) specificity of the reaction / I. A. Butovich, S. M. Luk'Yanova, C. C. Reddy // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2000. – Vol.378. – №1. – P. 65-77.
41. The role of 4-hydroxy-TEMPO in the reaction of the linoleyl alcohol oxidation by potato tuber 5-lipoxygenase / O. V. Kharchenko, T. D. Skaterna, M. G. Kazachkov, I. A. Butovich // *Biopolymers and cell*. – 2001. – Vol.17. – №2. – P. 147-151
42. Butovich I.A. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: Possible mechanism and the role of carboxylic group in substrate binding / I. A. Butovich, S. M. Lukyanova, C. C. Reddy // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1998. – Vol.249. – №2. – P. 344-349.
43. Харитоненко Г.І. Дослідження взаємодії 5-ліпоксигенази з алостеричним ефектором – додецилсульфатом натрію./ Г.І. Харитоненко, Т.Д. Скатерна, А.К. Мельник [та ін.] // *Укр.. біохім. журн.* – 2008. – Т.80. – №3. – С. 31-39.
44. Began G. Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles / G. Began, E. Sudharshan, A. G. Appu Rao // *Biochemistry*. – 1999. – Vol.38. – №42. – P. 13920-13927.
45. Gardner H.W. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism / H. W. Gardner // *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. – 1989. – Vol.1001. – №3. – P. 274-281.

46. Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics / M. A. Noordermeer, A. J. H. Van Dijken, S. C. M. Smeekens [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – Vol.267. – №9. – P. 2473-2482.
47. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М: Наука, 2002. – 293 с.
48. Oxidation of LDL by rabbit and human 15-lipoxygenase: Prevalence of nonenzymatic reactions / D. Heydeck, J. M. Upston, H. Viita [et al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2001. – Vol.42. – №7. – P. 1082-1088.
49. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes / O. Werz, E. Bürkert, B. Samuelsson [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol.99. – №3. – P. 1044-1052.
50. Werz O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology / O. Werz // *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. – 2002. – Vol.1. – №1. – P. 23-44.
51. Rådmark O. 5-Lipoxygenase-derived leukotrienes: Mediators also of atherosclerotic inflammation / O. Rådmark // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2003. – Vol.23. – №7. – P. 1140-1142.
52. Schewe T. Lipoxygenases: measurement, characterization and properties / T. Schewe, H. Kuhn, M. Rapoport // *Prostaglandins and related substances, a practical approach*. IRL press. Oxford. – 1987. – P. 229-249.
53. Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology / C. D. Funk // *Science*. – 2001. – Vol.294. – №5548. – P. 1871-1875.

54. Andreou A. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals / A. Andreou, F. Brodhun, I. Feussner // *Progress in Lipid Research*. – 2009. – Vol.48. – №3–4. – P. 148-170.
55. Howe G.A. Oxylipin metabolism in response to stress / G. A. Howe, A. L. Schillmiller // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2002. – Vol.5. – №3. – P. 230-236.
56. Mosblech A. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation / A. Mosblech, I. Feussner, I. Heilmann // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2009. – Vol.47. – №6. – P. 511-517.
57. Oxylipin Profiling Reveals the Preferential Stimulation of the 9-Lipoxygenase Pathway in Elicitor-treated Potato Cells / C. Göbel, I. Feussner, A. Schmidt [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol.276. – №9. – P. 6267-6273.
58. Potato tuber phospholipids contain colneleic acid in the 2-position / M. L. Fauconnier, T. D. Williams, M. Marlier, R. Welti // *FEBS Letters*. – 2003. – Vol.538. – №1-3. – P. 155-158.
59. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought / T. Savchenko, V. A. Kolla, C. Q. Wang [et al.] // *Plant Physiology*. – 2014. – Vol.164. – №3. – P. 1151-1160.
60. Devoto A. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis / A. Devoto, J. G. Turner // *Annals of Botany*. – 2003. – Vol.92. – №3. – P. 329-337.
61. 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis / N. Taki, Y. Sasaki-Sekimoto, T. Obayashi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol.139. – №3. – P. 1268-1283.
62. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів / І. В. Косаківська. – К: Сталь, 2003. – 191 с.

63. Busk P.K. Regulation of abscisic acid-induced transcription / P. K. Busk, M. Pages // *Plant molecular biology*. – 1998. – Vol.37. – №3. – P. 425-435.
64. Mauch-Mani B. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack / B. Mauch-Mani, J. P. Mettraux // *Annals of Botany*. – 1998. – Vol.82. – №5. – P. 535-540.
65. Шакирова Ф.М. Салициловая кислота - индуктор устойчивости растений / Ф. М. Шакирова // *Агрехимия*. – 2000. – Т. 11. – С. 87-95.
66. Khripach V. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century / V. Khripach, V. Zhabinskii, A. De Groot // *Annals of Botany*. – 2000. – Vol.86. – №3. – P. 441-447.
67. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. / Ф. М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001.- 160 с.
68. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves / D. M. Saravitz, J. N. Siedow // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol.110. – №1. – P. 287-299.
69. Molecular characterization of L2 lipoxygenase from maize embryos / A. B. Jensen, E. Poca, M. Rigaud [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1997. – Vol.33. – №4. – P. 605-614.
70. Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings - Lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes / H. Weichert, A. Kolbe, A. Kraus [et al.] // *Planta*. – 2002. – Vol.215. – №4. – P. 612-619.
71. Bell E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis* / E. Bell, R. A. Creelman, J.

- E. Mullet // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – Vol.92. – №19. – P. 8675-8679.
72. Bate N.J. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes / N. J. Bate, S. J. Rothstein // Plant Journal. – 1998. – Vol.16. – №5. – P. 561-569.
73. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests / J. Royo, J. Leon, G. Vancanneyt [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1999. – Vol.96. – №3. – P. 1146-1151.
74. Early physiological and cytological events induced by wounding in potato tuber / A. A. Fabbri, C. Fanelli, M. Reverberi [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2000. – Vol.51. – №348. – P. 1267-1275.
75. Navari-Izzo F. Lipids of soybean and sunflower seedlings grown under drought conditions / F. Navari-Izzo, N. Vangioni, M. F. Quartacci // Phytochemistry. – 1990. – Vol.29. – №7. – P. 2119-2123.
76. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit / M. Maccarrone, G. A. Veldink, A. Finazzi Agro, J. F. G. Vliegthart // FEBS Letters. – 1995. – Vol.371. – №3. – P. 223-226.
77. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions / H. Porta, P. Rueda-Benitez, F. Campos [et al.] // Plant and Cell Physiology. – 1999. – Vol.40. – №8. – P. 850-858.
78. Savchenko T. Drought stress modulates oxylipin signature by eliciting 12-OPDA as a potent regulator of stomatal aperture / T. Savchenko, K. Dehesh // Plant signaling & behavior. – 2014. – Vol.9. – №3. – P. 362-375

- 79.Changes in salicylic and abscisic acid contents during heat treatment and their effect on thermotolerance of grape plants / L. J. Wang, W. D. Huang, Y. P. Liu, J. C. Zhan // Russian Journal of Plant Physiology. – 2005. – Vol.52. – №4. – P. 516-520.
- 80.Creelman R.A. Biosynthesis and action of jasmonates in plants / R.A. Creelman, J.E. Mullet // 1997. - 355-381.
- 81.Parchmann S. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures / S. Parchmann, H. Gundlach, M. J. Mueller // Plant Physiology. – 1997. – Vol.115. – №3. – P. 1057-1064.
- 82.The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis / L. Xu, F. Liu, E. Lechner [et al.] // Plant Cell. – 2002. – Vol.14. – №8. – P. 1919-1935.
- 83.Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment / M. Kohlmann, A. Bachmann, H. Weichert [et al.] // European Journal of Biochemistry. – 1999. – Vol.260. – №3. – P. 885-895.
- 84.Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding / A. A. Vieira, M. G. De Almeida Oliveira, I. C. Jose [et al.] // Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. – 2001. – Vol.13. – №1. – P. 5-12..
- 85.Browse J. Jasmonate: An Oxylipin Signal with Many Roles in Plants. 2005. - 431-456.
- 86.Creelman R.A. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress / R. A. Creelman, J. E. Mullet // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – Vol.92. – №10. – P. 4114-4119.

87. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways / S. Blechert, W. Brodschelm, S. Holder [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – Vol.92. – №10. – P. 4099-4105.
88. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack / J. Engelberth, H. T. Alborn, E. A. Schmelz, J. H. Tumlinson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol.101. – №6. – P. 1781-1785.
89. Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production / J. Leon, J. Royo, G. Vancanneyt [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.277. – №1. – P. 416-423.
90. Влияние продукта липоксигеназного метаболизма – 12-гидроксидодеценовой кислоты на фосфорилирование белков растений / Ф. Г. Каримова, И. А. Тарчевский, Н. У. Мурсалимова, А. Н. Гречкин // *Физиология растений*. – 1999. – Т. 46. – №1. – P. 148-152.
91. Гречкин А.Н. Липоксигеназная сигнальная система / А. Н. Гречкин, И. А. Тарчевский // *Физиология растений*. – 1999. – Т. 46. – №1. – С. 132-142.
92. Potato tubers exhibit both homolytic and heterolytic hydroperoxide fatty acid-cleaving activities / M. L. Fauconnier, J. Delcarte, P. Hoyaux [et al.] // *Biochemical Society Transactions*. – 2000. – Vol.28. – №6. – P. 853-855.
93. Reymond P. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression / P. Reymond, E. E. Farmer // *Current Opinion in Plant Biology*. – 1998. – Vol.1. – №5. – P. 404-411.
94. Farmer E.E. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory / E. E. Farmer, E. Alm eras, V.

- Krishnamurthy // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2003. – Vol.6. – №4. – P. 372-378.
95. Vick B.A. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase / B. A. Vick, D. C. Zimmerman // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1983. – Vol.111. – №2. – P. 470-477.
96. Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid ω -3 fatty acid desaturase gene (FAD7) through different signal transduction pathways / T. Nishiuchi, T. Hamada, H. Kodama, K. Iba // *Plant Cell*. – 1997. – Vol.9. – №10. – P. 1701-1712.
97. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate / M. A. Melan, X. Dong, M. E. Endara [et al.] // *Plant Physiology*. – 1993. – Vol.101. – №2. – P. 441-450.
98. Laudert D. Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling / D. Laudert, E. W. Weiler // *Plant Journal*. – 1998. – Vol.15. – №5. – P. 675-684.
99. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns / J. Royo, G. Vancanneyt, A. G. Perez [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol.271. – №35. – P. 21012-21019.
100. Blee E. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides / E. Blee, J. Joyard // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol.110. – №2. – P. 445-454.
101. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves / G. I. Arimura, R. Ozawa, T. Shimoda [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol.406. – №6795. – P. 512-515.

102. Bell E. Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding / E. Bell, J. E. Mullet // *Plant Physiology*. – 1993. – Vol.103. – №4. – P. 1133-1137.
103. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants / H. Pena-Cortes, J. Fisahn, L. Willmitzer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – Vol.92. – №10. – P. 4106-4113.
104. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis / G. K. Pandey, J. J. Grant, Y. H. Cheong [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol.139. – №3. – P. 1185-1193.
105. Grove M.D. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen / M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder // *Nature*. – 1979. – Vol.281. – №5728. – P. 216-217.
106. Khripach V.A. Brassinosteroids a New Class of Plant Hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. E. de Groot. – San Diego: Academic Press, 1999.
107. Sakurai A Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones / A. Sakurai, T. Yokota, S. D. Clouse. – Tokyo: Springer-Verlag, 1999.
108. Metabolic transformation of the brassinosteroid 24-epicastasterone by the cockroach *Periplaneta americana* / J. Schmidt, K. Richter, B. Voigt, G. Adam // *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. – 2000. – Vol.55. – №3-4. – P. 233-239.
109. Selective Interaction of Triazole Derivatives with DWF4, a Cytochrome P450 Monooxygenase of the Brassinosteroid Biosynthetic Pathway, Correlates with Brassinosteroid Deficiency in Planta / T. Asami, M. Mizutani, S. Fujioka [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol.276. – №28. – P. 25687-25691.

110. Bishop G.J. Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response / G. J. Bishop, T. Yokota // *Plant and Cell Physiology*. – 2001. – Vol.42. – №2. – P. 114-120.
111. Clouse S.D. Brassinosteroid signaling: Novel downstream components emerge / S. D. Clouse // *Current Biology*. – 2002. – Vol.12. – №14.
112. Kim T.H. Repressors of photomorphogenesis / T. H. Kim, B. H. Kim, A. G. Von Arnim // *International Review of Cytology*. – 2002. – Vol.220. – P. 185-223.
113. Bajguz A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants / A. Bajguz, A. Tretyn // *Phytochemistry*. – 2003. – Vol.62. – №7. – P. 1027-1046.
114. Schaller H. The role of sterols in plant growth and development / H. Schaller // *Progress in Lipid Research*. – 2003. – Vol.42. – №3. – P. 163-175.
115. Symons G.M. Interactions between Light and Plant Hormones during De-etiolation / G. M. Symons, J. B. Reid // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2003. – Vol.22. – №1. – P. 3-14.
116. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in arabidopsis / H. Goda, Y. Shimada, T. Asami [et al.] // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol.130. – №3. – P. 1319-1334.
117. Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana* / R. Morillon, M. Catterou, R. S. Sangwan [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol.212. – №2. – P. 199-204.
118. Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull mutant / M. Catterou, F. Dubois, H. Schaller [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol.212. – №5-6. – P. 673-683.

119. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem / Z. Hong, M. Ueguchi-Tanaka, S. Shimizu-Sato [et al.] // *Plant Journal*. – 2002. – Vol.32. – №4. – P. 495-508.
120. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: Effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents / Y. Miyazawa, N. Nakajima, T. Abe [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – Vol.54. – №393. – P. 2669-2678.
121. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana* / M. Nakaya, H. Tsukaya, N. Murakami, M. Kato // *Plant and Cell Physiology*. – 2002. – Vol.43. – №2. – P. 239-244.
122. The leaf morphologies of the subtropical rheophyte *Solenogyne mikadoi* and its temperate relative *S. bellioides* (Asteraceae) are affected differently by plant hormones and their biosynthesis inhibitors / R. D. Itoh, N. Nakahara, T. Asami, T. Denda // *Journal of Plant Research*. – 2005. – Vol.118. – №3. – P. 181-186.
123. Clouse S.D. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development / S. D. Clouse, J. M. Sasse // *Annual Review of Plant Biology*. – 1998. – Vol.49. – P. 427-451.
124. Li J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction / J. Li, J. Chory // *Cell*. – 1997. – Vol.90. – №5. – P. 929-936.
125. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression / S. D. Clouse // *Molecular Cell*. – 2002. – Vol.10. – №5. – P. 973-982.
126. Vert G. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling / G. Vert, J. Chory // *Nature*. – 2006. – Vol.441. – №1. – P. 96-100.

127. The brassinosteroid signal transduction pathway / Z. Y. Wang, Q. Wang, K. Chong [et al.] // *Cell Research*. – 2006. – Vol.16. – №5. – P. 427-434.
128. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants / G. Vert, J. L. Nemhauser, N. Geldner [et al.] // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2005. – Vol.21. – P. 177-201.
129. Mussig C. Genomic Brassinosteroid Effects / C. Mussig, T. Altmann // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2003. – Vol.22. – №4. – P. 313-324.
130. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings / S. Dhaubhadel, S. Chaudhary, K. F. Dobinson, P. Krishna // *Plant Molecular Biology*. – 1999. – Vol.40. – №2. – P. 333-342.
131. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress / S. Dhaubhadel, K. S. Browning, D. R. Gallie, P. Krishna // *Plant Journal*. – 2002. – Vol.29. – №6. – P. 681-691.
132. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice / H. Nakashita, M. Yasuda, T. Nitta [et al.] // *Plant Journal*. – 2003. – Vol.33. – №5. – P. 887-898.
133. Sasse J.M. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update / J. M. Sasse // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2003. – Vol.22. – №4. – P. 276-288.
134. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis / C. Mussig, C. Biesgen, J. Lisso [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2000. – Vol.157. – №2. – P. 143-152.

135. 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis / F. Schaller, C. Biesgen, C. Mussig [et al.] // *Planta*. – 2000. – Vol.210. – №6. – P. 979-984.
136. Mussig C. Brassinosteroid-regulated gene expression / C. Mussig, S. Fischer, T. Altmann // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol.129. – №3. – P. 1241-1251.
137. Contribution of lipoxygenase metabolism to the brassinosteroid signaling pathway / E. O. Fedina, F. G. Karimova, I. R. Chechetkin [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – Vol.395. – №1-6. – P. 80-83.
138. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls / R. Cerana, A. Bonetti, M. T. Marre [et al.] // *Physiol. Plant*. – 1983. – Vol.59. – №1. – P. 23–27.
139. Wang T.W. Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv Lei-Choi) / T. W. Wang, D. J. Cosgrove, R. N. Arteca // *Plant Physiology*. – 1993. – Vol.101. – №3. – P. 965-968
140. Tominaga R. Brassinolide-induced elongation of inner tissues of segments of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls / R. Tominaga, N. Sakurai, S. Kuraishi // *Plant and Cell Physiology*. – 1994. – Vol.35. – №7. – P. 1103-1106.
141. Mayumi K. A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of azuki bean epicotyls / K. Mayumi, H. Shibaoka // *Plant and Cell Physiology*. – 1995. – Vol.36. – №1. – P. 173-181.
142. Munoz F.J. Brassinolides promote the expression of a new *Cicer arietinum* γ -tubulin gene involved in the epicotyl elongation / F. J. Munoz, E. Labrador, B. Dopico // *Plant Molecular Biology*. – 1998. – Vol.37. – №5. – P. 807-817.

143. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development / A. Kauschmann, A. Jessop, C. Koncz [et al.] // *Plant Journal*. – 1996. – Vol.9. – №5. – P. 701-713.
144. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis* / C. Wang, C. A. Zien, M. Afitlhile [et al.] // *Plant Cell*. – 2000. – Vol.12. – №11. – P. 2237-2246.
145. In vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD?, to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis* / C. A. Zien, C. Wang, X. Wang, R. Welti // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2001. – Vol.1530. – №2-3. – P. 236-248.
146. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D? / Y. Sang, S. Zheng, W. Li [et al.] // *Plant Journal*. – 2001. – Vol.28. – №2. – P. 135-144.
147. Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial Δ^3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum* / C. Kirsch, M. Takamiya-Wik, S. Reinold [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol.94. – №5. – P. 2079-2084.
148. Ryu S.B Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves / S. B. Ryu, X. Wang // *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. – 1998. – Vol.1393. – №1. – P. 193-202.
149. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence / Y. Hong, T. W. Wang, K. A. Hudak [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol.97. – №15. – P. 8717-8722.

150. Katagiri T. Involvement of a novel Arabidopsis phospholipase D, AtPLD?, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling / T. Katagiri, S. Takahashi, K. Shinozaki // *Plant Journal*. – 2001. – Vol.26. – №6. – P. 595-605.
151. Ford-Hutchinson A.W. Modification of the lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism / A. W. Ford-Hutchinson // *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research*. – 1990. – Vol.20. – P. 161-169.
152. Регуляторная роль фосфолипидов в реакции окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой / И. А. Бутович, Т. В. Паршикова, В. М. Бабенко [и др.] // *Биол. мембраны*. – 1992. – Т. 9. – №6. – P. 611-616.
153. Butovich I.A. On the interfacial phenomena in lipoxygenase catalysis / I. A. Butovich, O. V. Kharchenko, V. M. Babenko // *Adv. Prostaglandin Tromboxane Leukot. Res.* – 1995. – Vol.23. – P. 159-161.
154. Бутович И.А. Роль фосфолипидов в регуляции каталитической активности 12-липоксигеназы из лейкоцитов свиньи / И. А. Бутович, О. В. Харченко // *Укр.биохим.журн.* – 1999. – Т. 71. – №1. – С. 38-43.
155. Скатерна Т.Д. Вплив фосфатидної кислоти на реакцію окислення лінолевої кислоти 5-ліпоксигеназою з бульб картоплі / Т. Д. Скатерна, О. В. Харченко // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – Т. 80. – №3. – С. 21-30.
156. Харитоненко Г.І. Фосфатидилхолін і фосфатидилінозит - алостеричні регулятори 5-ліпоксигенази з бульб картоплі / Г. І. Харитоненко, О. В. Харченко // *Біополімери і клітина*. – 2008. – Т. 24. – №3. – С. 253-260.

157. Wang C. A novel phospholipase D of Arabidopsis that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane / C. Wang, X. Wang // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol.127. – №3. – P. 1102-1112.
158. Phospholipase D: Molecular and cell biology of a novel gene family / M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, X. Tang // *Biochemical Journal*. – 2000. – Vol.345. – №3. – P. 401-415.
159. Kasai K. Changes in the respiratory pathways during germination and early seedling growth of common wheat under normal and NaCl-stressed conditions / K. Kasai, N. Mori, C. Nakamura // *Cereal Research Communications*. – 1998. – Vol.26. – №2. – P. 217-224.
160. Savchenko T.V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance / T. V. Savchenko, O. M. Zastrijnaja, V. V. Klimov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2014. – Vol.79. – №4. – P. 362-375.
161. Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck / G. Ben-Hayyim, Y. Gueta-Dahan, O. Avsian-Kretchmer [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol.212. – №3. – P. 367-375.
162. Aziz A. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L / A. Aziz, F. Larher // *Journal of Plant Physiology*. – 1998. – Vol.153. – №5-6. – P. 754-762.
163. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress / A. Sofu, B. Dichio, C. Xiloyannis, A. Masia // *Physiologia Plantarum*. – 2004. – Vol.121. – №1. – P. 58-65.
164. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments / A. Nemchenko, S. Kunze, I.

- Feussner, M. Kolomiets // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – Vol.57. – №14. – P. 3767-3779.
165. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes / A. D. De Azevedo Neto, J. T. Prisco, J. Eneas-Filho [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2006. – Vol.56. – №1. – P. 87-94.
166. Roychoudhury A. Effects of exogenous abscisic acid on some physiological responses in a popular aromatic indica rice compared with those from two traditional non-aromatic indica rice cultivars / A. Roychoudhury, S. Basu, D. N. Sengupta // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2009. – Vol.31. – №5. – P. 915-926.
167. Abiàn J. Effect of abscisic-acid on the linoleic-acid metabolism in developing maize embryos / J. Abiàn, E. Gelpi, M. Pages // *Plant Phys.* – 1991. – Vol.95. – №4. – P. 1277-11283.
168. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay / L. G. Deluc, D. R. Quilici, A. Decendit [et al.] // *BMC Genomics*. – 2009. – Vol.10.
169. Zhang C. The effect of heat shock on paclitaxel production in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures: Role of abscisic acid pretreatment / C. Zhang, P. S. Fevereiro // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2007. – Vol.96. – №3. – P. 506-514.
170. Relationship between lipoxygenase and ABA and JA in wounded signal transduction of healthy populus seedlings / K. W. Zhang, Y. An, Z. H. Hu [et al.] // *Forest Research*. – 2005. – Vol.18. – №3. – P. 300-304.
171. Lipoxygenases from *Zea mays* L. Purification and physicochemical characteristics / E. Poca, H. Rabinovitch-Chable, J.

- Cook-Moreau [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. – 1990. – Vol.1045. – №2. – P. 107-114.
172. Regulation of lipoxygenase gene expression in potato mini-tubers by phytohormones / O. Lemeza, Y. O. Zubo, V. Kusnetsov // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2010. – Vol.57. – №5. – P. 715-719.
173. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol.72. – №1-2. – P. 248-254.
174. Schilstra M. Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis / M. Schilstra, G. Veldink, J. Vliegthart // *Lipids*. – 1994. – Vol.29. – №4. – P. 225-231.
175. Gibian M.J. Product yield in oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: The value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay / M. J. Gibian, P. Vandenberg // *Analytical Biochemistry*. – 1987. – Vol.163. – №2. – P. 343-349.
176. Fatty acid hydroperoxides biotransformation by potato tuber cell-free extracts / M. L. Fauconnier, J. Delcarte, M. Jaziri [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2002. – Vol.159. – №10. – P. 1055-1060.
177. Vick B.A. A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase / B. A. Vick // *Lipids*. – 1991. – Vol.26. – №4. – P. 315-320
178. Виноградова Р.П. Біологічна хімія. Практикум / Р. П. Виноградова, Н. Є. Кучеренко, А. Р. Литвиненко // К.: Вища школа. – 1977. – P. 384.
179. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots / S. H. Lee, S. J. Ahn, Y. J. Im [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol.330. – №4. – P. 1194-1198.

180. Molecular analysis of brassinosteroid action / C. Mussig, J. Lisso, D. Coll-Garcia, T. Altmann // *Plant Biology*. – 2006. – Vol.8. – №3. – P. 291-296.
181. Characterization of the substrate aggregation state in 5-lipoxygenase oxidation of linoleic acid / I. A. Butovich, O. V. Kharchenko, Y. N. Naboka, M. G. Kazachkov // *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. – 2001. – Vol.73. – №2. – P. 42-43.
182. Kharchenko O.V. Kinetic mechanisms of linoleic acid oxidation by 5-lipoxygenase from *Solanum tuberosum* L / O. V. Kharchenko, H. I. Kulinichenko, I. A. Butovych // *Kinetychni mekhanizmy okyslennia linolevoi? kysloty 5-lipoksyhenazoiu iz Solanum tuberosum* L. – 1999. – Vol.71. – №4. – P. 40-44.
183. Hydrophobic nitroxyl radicals inhibit linoleyl alcohol oxidation by 5-lipoxygenase / A. I. Vovk, O. V. Kharchenko, A. I. Kharitonenko [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2004. – Vol.30. – №4. – P. 391-395.
184. Inhibiting properties of stable nitroxyl radicals in reactions of linoleyl acid and linoleyl alcohol oxidation catalyzed by 5-lipoxygenase / O. V. Kharchenko, A. I. Kharitonenko, A. I. Vovk [et al.] // *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. – 2005. – Vol.77. – №1. – P. 52-57.
185. The influence of physicochemical factors on linoleic acid oxidation by lipoxygenase / I. A. Butovich, E. Tsys, T. V. Mogilevich, V. P. Kukhar // *Bioorg. Khim.* – 1991. – Vol.17. – №10. – P. 1273-1280.
186. Blée E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense / E. Blée // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol.7. – №7. – P. 315-321.

187. Farmer E.E. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors / E. E. Farmer, C. A. Ryan // *Plant Cell*. – 1992. – Vol.4. – №2. – P. 129-134.
188. Effect of 12-hydroxydodecenoic acid, a product of the lipoxygenase pathway, on plant protein phosphorylation / F. G. Karimova, I. A. Tarchevsky, N. U. Mursalimova, A. N. Grechkin // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 1999. – Vol.46. – №1. – P. 128-131.
189. Influence of (9Z)-12-hydroxy-9-dodecenoic acid and methyl jasmonate on plant protein phosphorylation / I. A. Tarchevsky, F. G. Karimova, A. N. Grechkin, N. U. Moukhametchina // *Biochemical Society Transactions*. – 2000. – Vol.28. – №6. – P. 870-871.
190. Monroy A.F. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression: Evidence for a role of calcium / A. F. Monroy, F. Sarhan, R. S. Dhindsa // *Plant Physiology*. – 1993. – Vol.102. – №4. – P. 1227-1235.
191. Factors affecting reaction of cucumber root lipoxygenase in phospholipid vesicle dispersions / Y. Mizutani, Y. Matsumura, S. Matsumoto [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2002. – Vol.25. – №2. – P. 171-181.
192. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots / A. Moons, E. Prinsen, G. Bauw, M. Van Montagu // *Plant Cell*. – 1997. – Vol.9. – №12. – P. 2243-2259.
193. Косаківська І.В. Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків / І. В. Косаківська, І. В. Голов'ячко // *Український фітоценологічний збірник*. – 2006. – №24. – С. 3-17.
194. Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks / T. Savchenko, J. W.

- Walley, E. W. Chehab [et al.] // *The Plant Cell Online*. – 2010. – Vol.22. – №10. – P. 3193-3205.
195. Тарчевский И. Влияние элиситоров на ионные потоки и электрические потенциалы растений / И. Тарчевский // *Физиол. раст.* . – 2000. – С. 321-333.
196. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis / V. Gosset, N. Harmel, C. Göbel [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol.60. – №4. – P. 1231-1240.
197. Responses of phospholipase D and lipoxygenase to mechanical wounding in postharvest cucumber fruits / Y.-y. Zhao, C.-l. Qian, J.-c. Chen [et al.] // *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. – 2010. – Vol.11. – №6. – P. 443-450.
198. The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway / X. Tong, J. Qi, X. Zhu [et al.] // *The Plant Journal*. – 2012. – Vol.71. – №5. – P. 763-775.
199. Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling / R. J. León-Morcillo, J. Ángel, H. Vierheilig [et al.] // *Journal of experimental botany*. – 2012.. – Vol.63. – №10. – С. 3545-58
200. Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants / S. Lee, S. Suh, S. Kim [et al.] // *Plant Journal*. – 1997. – Vol.12. – №3. – P. 547-556.
201. Batsmanova L. Oxidation Stress is Adaptative Reaction Inductor of Winter Wheat Plants / L. Batsmanova, N. Taran, A. Kosyan // *Agriculture (Polnohospodárstvo)*. – 2014. – Vol.60. – №2. – P. 70-76.

202. Hou Q. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress / Q. Hou, G. Ufer, D. Bartels // *Plant, cell & environment*. – 2016. . – Vol.39. – №5. – P. 1029-1048.
203. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism / K. Matsui // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2006. – Vol.9. – №3. – P. 274-280.
204. Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants / T. Savchenko, I. S. Pearse, L. Ignatia [et al.] // *The Plant Journal*. – 2013. – Vol.73. – №4. – P. 653-662.
205. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance / G. Vancanneyt, C. Sanz, T. Farmaki [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol.98. – №14. – P. 8139-8144.
206. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts / T. Farmaki, M. Sanmartín, P. Jiménez [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – Vol.58. – №3. – P. 555-568.
207. Fauconnier M.-L Lipid and oxylipin profiles during aging and sprout development in potato tubers (*Solanum tuberosum L.*) / M.-L. Fauconnier, R. Welti, E. Blée, M. Marlier // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2003. – Vol.1633. – №2. – P. 118-126.
208. Hornostaj A.R. Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds / A. R. Hornostaj, D. S. Robinson // *Food Chemistry*. – 2000. – Vol.71. – №2. – P. 241-247.
209. Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase / W. Mu, Q. Xue, B. Jiang, Y. Hua // *European Food Research and Technology*. – 2012. – Vol.234. – №4. – P. 723-731.

210. Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives / N. B. Akacha, S. Karboune, M. Gargouri, S. Kermasha // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2010. – Vol.160. – №3. – P. 901-911.
211. Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves / Z. Long, X. Kong, C. Zhang [et al.] // *European Food Research and Technology*. – 2010. – Vol.231. – №6. – P. 865-871.
212. Laxalt A.M. Phospholipid signalling in plant defence / A. M. Laxalt, T. Munnik // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2002. – Vol.5. – №4. – P. 332-338.
213. Бутович И.А. Активация окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой из клубней картофеля под влиянием фосфатидовой кислоты / И. А. Бутович, В. М. Бабенко, Л. В. Ливарчук // *Биохимия*. – 1991. – Т. 56. – №6. – С. 1077-1081.