

Академик АН ГрузССР С. В. ДУРМИШИДЗЕ, Т. В. БЕРИАШВИЛИ

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ КОЛЬЦА А ХОЛЕСТЕРОЛА РАСТИТЕЛЬНЫМИ ТКАНЯМИ В СТЕРИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Достижения биологической науки последних десятилетий показали общность не только основных процессов обмена веществ, поддерживающих жизнь и обеспечивающих развитие и размножение у всех организмов, но и обмен вторичных веществ растения и животного (¹). При сравнительном изучении вторичного обмена веществ у бактерий, растений и животных выявлено, что стероиды занимают одно из центральных мест. Холестерол является необходимым предшественником ряда гормонов и вместе с белками и фосфолипидами связан со структурой мембран (^{2, 3}). Многие стероиды, по-видимому, участвуют в контроле синтеза ферментов на хромосомном уровне (³). Превращения холестерина в животном организме заключаются во введении атома кислорода в различные положения, в ступенчатом отщеплении боковой цепи и углеродного атома метильной группы, а также в гидрировании и дегидрировании (²). Циклический компонент холестерина у животных остается почти без изменения (⁴).

Микроорганизмы, в отличие от животных организмов, подвергают разложению и циклический компонент холестерина (⁵). Холестерол содержится во многих растениях и является предшественником различных стероидов (^{6, 7}). Высшие растения содержат также стеролы, близкие по строению к холестеролу, в частности, циклический компонент у холестерола, β -ситостерола и стигмастерола одинаков. Недавно было показано, что в табаке (*Nicotiana tabacum* L) наблюдается взаимопревращение холестерола, компестерола и стигмастерола (⁸).

Однако расщепление циклического компонента холестерола растительными тканями пока остается неизученным и неизвестно какие функции выполняют стероиды в организме растений. Исследование метаболизма холестерола в растительной ткани могло бы пролить некоторый свет на участие стероидов в обмене веществ у растений. Недавно нами была показана возможность расщепления циклического компонента холестерола растениями (⁹). В настоящей статье рассматриваются результаты изучения метаболизма холестерола растительными тканями. Эксперименты были проведены с $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестеролом на изолированных тканях моркови (*Daucus carota*) и проростках кукурузы сорта «Аджаметис тетра» (*Zea mays*) в стерильных условиях. До применения препарат $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола несколько раз перекристаллизовывали из спирта и хроматографически проверяли на чистоту. Тканевая культура моркови выращивалась на среде Хеллера (¹⁰) в присутствии $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола в продолжение 1 мес. К среде Хеллера добавляли стерильную микросуспензию холестерола с расчетом 0,2 мг холестерола радиоактивностью 7,5 мкС на 50 мл питательной среды. Ткани моркови росли в 10 колбах. Каждая колба содержала по 40 г среды Хеллера. После опыта из 10 колб было собрано 30 г сырого веса ткани моркови. Стерильные проростки кукурузы помещались в специальные стеклянные сосуды, содержащие питательный раствор Кнопа. В среду Кнопа $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерол вносился в виде суспензии 1 мг на 12 г сырого веса растительной ткани, когда проростки кукурузы были 12-дневные. Ввод такого количества экзогенного холестерола в растения не вызывает существенного изменения эндогенного баланса стероидов (^{6, 8}). Предва-

Включение радиоактивного углерода $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола во фракции различных соединений

Объект исследования	Концентрация $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола в средах Хеллера и Клоппа, M	Радиоактивность ткани в имп/мин·г	Сырой вес ткани, г	Радиоактивность каждой фракции, % к Σ фракции			
				выделенный CO_2	органические кислоты и фенолоспирты	липиды, включая свободный и связанный холестерин	биополимеры
Изолированные ткани моркови	$0,5 \cdot 10^{-5}$	10^5	30	4,3	41,6	34,5	19,6
Проростки кукурузы	$0,5 \cdot 10^{-5}$						
корни		$2,88 \cdot 10^5$	9	—	18,0	75,0	6,6
листья и стебли		$0,84 \cdot 10^4$	25	22,6	58,6	18,8	0
Проростки кукурузы	$1 \cdot 10^{-5}$						
корни		$6,12 \cdot 10^5$	9	—	17,7	77,7	4,4
листья и стебли		$0,22 \cdot 10^5$	27	10,7	72,2	17,1	0

рительными опытами было установлено, что $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерол в концентрации от $0,5 \cdot 10^{-5} M$ до $1 \cdot 10^{-5} M$ не влияет на рост и развитие ткани моркови и проростков кукурузы. 12-дневные проростки кукурузы на среде с $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестеролом оставались в продолжение 6 дней. За это время растения выросли на 15–20 см. Радиоактивность выделенного CO_2 в опытах определялась в виде $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$. После опытов растительный материал фиксировался кипящим этанолом, и органические кислоты и аминокислоты идентифицировались хроматографическим методом (11). Фенольные кислоты определялись методом хроматографии на бумаге в системах растворителей бензол — уксусная кислота — вода (10:7:3) и 2% уксусная кислота (12). Для определения липидов материал экстрагировали 95% этанолом, затем выпаривали досуха. Остаток растворяли в малом количестве воды и фильтровали. В фильтрате определяли органические кислоты, аминокислоты, фенолокислоты и другие метаболиты. Осадок растворяли в спирте и бензоле и измеряли радиоактивность липидов (13). Результаты анализов показали, что $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерол усваивается и подвергается глубокому превращению культурой растительной ткани и корнями растения. Ткани моркови, корни, стебли и листья кукурузы оказались высокордиоактивными (табл. 1). Радиоактивность $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола из корней передвигалась в стебли и листья растений. В тканях корней, где происходит непосредственное усвоение холестерола, основное количество радиоактивности остается в липидной фракции. Часть радиоактивного углерода кольца А холестерола включается в алифатические соединения — в органические кислоты и аминокислоты, а часть выделяется в виде $^{14}\text{CO}_2$. Радиоактивность выделенного углекислого газа колеблется от 4 до 20% радиоактивности метаболитированного $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола. Выявляется определенная зависимость между концентрацией холестерола в питательной среде и количеством выделенного растением радиоактивного углекислого газа. Повышение концентрации холестерола в питательной среде сопровождается понижением выделения $^{14}\text{CO}_2$. Очевидно, выше определенной концентрации экзогенный холестерол изменяет ход обмена веществ в клетке. Суммарное выделение $^{14}\text{CO}_2$, возможно, связано с воздействием холестерола на малатдегидрогеназу. Известно влияние холестерола на активность ряда ферментов углеводного и азотного обменов. Однако общее направление превращения холестерола в обоих опытах одинаково.

Радиоактивность идентифицированных ^{14}C -соединений при превращении $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола

Объект исследования	Концентрация ^{14}C -холестерола в среде Кнопа, М	Радиоактивность органических кислот, % от общей радиоактивности ткани	Радиоактивность отдельных кислот и фенолоксилов, % от их суммарной радиоактивности			
			янтарная кислота	Фумаровая кислота	фенолоксиловы	
Проростки кукурузы корни	$0,5 \cdot 10^{-5}$	листья и стебли	11,0	16,4	81,1	2,3
		листья и стебли	17,6	12,5	37,5	50,0
Проростки кукурузы корни	$1 \cdot 10^{-5}$	листья и стебли	12,9	27,2	51,1	21,7
		листья и стебли	48,2	16,0	71,1	12,9

Метаболическая особенность тканевой культуры моркови при усвоении $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола выявляется в усиленном связывании радиоактивности с биополимерами и в сравнительно низком уровне окисления радиоактивного углерода до $^{14}\text{CO}_2$. По-видимому, следует приять во внимание и условия опыта; ткани моркови с начала же опыта выращивались на среде, содержащей $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерол. Как известно, холестерол связывается с биополимерами, в частности, с белками и углеводами.

Связанный холестерол отдельно не был определен нами. Холестерол и продукты его превращения передвигаются по растению. После опытов стебли содержали как продукты расщепления $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола, так и радиоактивные стероиды. Радиоактивный углерод холестерола ^{14}C включается в органические кислоты, аминокислоты, фенолоксиловы, белки и другие соединения. Из проростков кукурузы идентифицированы радиоактивные янтарная, фумаровая кислоты и фенолоксиловы (табл. 2). Среди свободных аминокислот радиоактивными оказались глицин, аланин, глутаминовая кислота, лейцин. Из аминокислот белковых веществ радиоактивными были аланин, валин и лейцин. Радиоактивность всех идентифицированных соединений составляла $\sim 40\%$ радиоактивности метаболитизированного холестерола. Опыты были проведены и на стерильных 10-дневных проростках фасоли. Распределение радиоактивного углерода холестерола между идентифицированными алифатическими соединениями оказалось приблизительно таким же, как и при превращении $4\text{-}^{14}\text{C}$ -холестерола в проростках кукурузы.

Таким образом, выделение радиоактивного углекислого газа и идентификация радиоактивных индивидуальных соединений с открытой цепью показали, что в растительной ткани при превращении холестерола происходит и расщепление его кольца А. Радиоактивность расщепленной части кольца А холестерола составляла 4–8% радиоактивности усвоенного растением холестерола.

Химизм расщепления холестерола в растениях пока не изучен. На основе литературных данных (14 , 15) и наших экспериментов расщепление кольца А холестерола можно представить в следующем виде: дегидрирование (ароматизация) кольца А, гидроксильрование в 4-положение, расщепление кольца В и образование секо-соединения, окисление четвертого углерода в карбоксильную группу, отщепление кольца А в виде C_6 -фрагмента (широкатехина) и образование кетокислоты. Продукты ферментативного окисления этих соединений могут образовывать идентифицируемые нами вещества. По-видимому, в растениях должны присутствовать соответствующие стероид-гидроксилазы, а стероиды в растительной ткани

могут превращаться в секо-стероиды. Что происходит с кольцами С и Д холестерина в растительной ткани пока неизвестно. На каждой ступени расщепления стероидных соединений протекают обратимые реакции гидрирования и дегидрирования, вследствие чего в растениях может образовываться довольно большое число еще неизвестных соединений.

Установление возможности расщепления кольца А холестерина в растениях имеет определенное значение и в смысле метаболизма стероидных алкалоидов. Дальнейшие исследования покажут, какие продукты глубокого превращения фитостероинов образуются в растениях и каковы их специфические функции в клетке.

Считаем приятным долгом принести благодарность А. Б. Месхи за оказанную нам помощь при проведении опытов.

Институт биохимии растений
Академии наук ГрузССР

Поступило
22 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Mothes, *Pflanzen und Tier ein Vergleich auf der ebene des Sekundärstoffwechsels*, Wien - N. Y., 1973. ² S. I. Stohs, B. Kaul, E. I. Staba, *Phytochemistry*, v. 8, 1679 (1969). ³ W. D. Stein, *The Movement of Molecules Across Cell Membranes*, AP, 1967. ⁴ Э. Хефтман, *Биохимия стероидов*, М., 1972. ⁵ А. А. Имшенецкий, Л. А. Маврина, *Микробиология*, т. 37, № 4, 620 (1968). ⁶ L. J. Goad, *Terpenoids in Plants*, London - N. Y., 1967. ⁷ В. А. Пасешниченко, А. Р. Гусева, *Усп. биол. хим.*, т. 14, «Наука», 1973. ⁸ T. C. Tso, A. L. S. Cheng, *Phytochemistry*, v. 10, 2133 (1971). ⁹ S. V. Durmishidze, *Abstr. 7th Meeting FEBS, Varna, 1971*, p. 264. ¹⁰ Р. Г. Бугенко, *Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений*, М., 1964. ¹¹ Р. Я. Школьник, Н. Г. Доман, *Биохимия*, т. 25, № 2, 276 (1960). ¹² E. Wong, A. O. Taylor, *J. Chromatography*, v. 9, 4, 449 (1962). ¹³ R. D. Bennett, E. Heftmann, B. J. Winter, *Phytochemistry*, v. 8, 12, 2325 (1969). ¹⁴ C. Hörhold, K. H. Böhme, K. Schubert, *Zs. Allgem. Mikrobiol.*, B. 9, 3, 235 (1969). ¹⁵ D. F. Johnson, J. A. Waters, R. D. Bennett, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 108, 2, 282 (1964).