

УДК 550.43

СТЕРОИДНЫЕ ФИТОГОРМОНЫ В УГОЛЬНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЯХ: ГЕОХИМИЧЕСКИЙ МОСТ МЕЖДУ ДРЕВНИМИ И СОВРЕМЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ

© 2021 г. Иностраный член РАН Р. Г. Гарецкий¹, А. В. Барановский², В. Н. Жабинский²,
Р. П. Литвиновская², А. Г. Прядко³, А. Л. Савчук², С. А. Фатыхова²,
В. А. Хрипач^{2,*}, П. С. Шабуня²

Поступило 11.01.2021 г.

После доработки 12.01.2021 г.

Принято к публикации 13.01.2021 г.

Образцы угля и торфа разного возраста из месторождений Беларуси впервые были исследованы на содержание растительных стероидных гормонов (брасиностероидов) с использованием независимых методов иммуоферментного анализа и ВЭЖХ–МС–МС. Количественное определение брасиностероидов показало, что все исследованные образцы содержали фитогормоны основных природных групп (брасинолида, 24-эпибрасинолида и 28-гомобрасинолида), за исключением брасинолида в самом древнем образце. Измеренное содержание брасиностероидов соответствовало таковому, характерному для современных растительных объектов, а состав брасиностероидов варьировал в зависимости от глубины залегания и других факторов. Полученные данные могут указывать на высокую стабильность стероидных гормонов растений и их предполагаемую роль биорегуляторов на протяжении длительного периода эволюции растений.

Ключевые слова: брасиностероиды, фитогормоны, бурый уголь, торф, иммуоферментный анализ, ВЭЖ–МС–МС

DOI: 10.31857/S2686739721040071

При обсуждении ранней химической эволюции основной упор обычно делается на путях синтеза пребиотиков, ведущих к важнейшим биомолекулам, таким как аминокислоты, пептиды, белки, сахара, нуклеиновые основания, нуклеотиды, которые являются элементами критически значимых полимерных структур живой клетки. В то же время сравнительно мало внимания уделяется низкомолекулярным факторам, таким как, например, стероидные гормоны, которые играют жизненно важную роль в качестве сигнальных и регуляторных органических веществ клетки. Будучи относительно простыми в химическом отношении, они могли занять свое место среди ключевых клеточных предэлементов на довольно ранней стадии химической эволюции и вступить в биотическую эру с полностью сформированной молекулярной структурой. В первую очередь это

касается стероидных гормонов, имеющих углеродный скелет стероидов, что позволяет считать их биогенетически сравнительно простыми и, возможно, наиболее древними. Типичными их представителями являются стероидные гормоны растений или брасиностероиды (БС).

Открытие БС, в настоящее время признанных новым классом растительных гормонов, стало важным событием, указывающим на разностороннюю роль стероидов как гормональных регуляторов, характерных для большинства организмов, населяющих Землю [1]. Несмотря на то что в некоторых отношениях они довольно хорошо изучены, особенно как ключевые клеточные сигнальные агенты, характерные для всех видов растений [2], БС остаются малоизученными с точки зрения их видовой, структурной, органной и временной специфичности действия и биогенеза. Можно ожидать, что как полиоксигенированные стероиды, структурно сходные с типичными для самых древних организмов, таких как иглокожие [3, 4], БС являются природными биорегуляторами очень древнего происхождения.

Таким образом, имея литературные данные о широком распространении различных стероидов, включая растительные стероиды, в геологиче-

¹ Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³ ООО “Хемма-тест”, Минск, Республика Беларусь

*E-mail: khripach@iboch.by

Таблица 1. Месторождения полезных ископаемых в Беларуси, из которых были отобраны исследуемые образцы

№	Образец	Месторождение	Глубина залегания, м	Возраст, млн лет
1	Бурый уголь мягкий	Лельчицкое	108	342
2	Бурый уголь плотный	Лельчицкое	162	342
3	Бурый уголь плотный	Букчанское	192	164–167
4	Бурый уголь землистый с лигнитом	Житковичское	40–50	21–27
5	Бурый уголь с лигнитом	Житковичское	40–50	21–27
6	Бурый уголь плотный с лигнитом	Житковичское	40–50	21–27
7	Торф	Туршовка-Чертовское	0.2–0.4	0.004–0.006

ских окаменелостях [5–9], мы заинтересовались поиском в их составе стероидных гормонов растений. Задача казалась непростой из-за специфической химической структуры и свойств БС, а также их крайне низкого естественного содержания в растениях (на несколько порядков ниже содержания растительных стеринов). Опираясь на наш положительный опыт обнаружения и количественного определения БС в растительных источниках, и вдохновленные нашим недавним открытием этих фитогормонов в образцах сырой нефти [10], мы получили новые данные, показывающие, что молекулярная структура БС очень консервативна и стабильна, а фитогормоны современных структурных типов могли входить в состав растений в течение сотен миллионов лет, вероятно, на протяжении всего периода эволюции растений на Земле.

Стероиды природных отложений являются важными биомаркерами – органическими соединениями, присутствующими в современных и ископаемых отложениях, которые сохраняют структурные особенности своих биологических предшественников или могут напрямую отражать стероид-специфический состав объекта, из которого они произошли. Стероиды, обнаруженные в природных отложениях, представлены стеролами, станолами, станонами и стенонами. Они являются индикаторами истории формирования отложений, и их измеренное содержание в изученных источниках колеблется от 10^{-6} до $10^{-3}\%$ [5–9]. На сегодняшний день лишь несколько исследований посвящено качественному и количественному составу стероидных соединений в природных объектах, таких как торф [5, 6], лигнит [6–8], морские отложения [4] и некоторых других. Однако до недавнего времени в литературе не было данных по обнаружению БС в месторождениях полезных ископаемых. В то же время их открытие может пролить свет на биорегуляторные механизмы, которые контролируют рост, развитие и адаптацию растений на ранних стадиях

эволюции, и нельзя исключать их участие в этих процессах в качестве биосигнальных молекул.

В данной работе на содержание БС исследованы шесть проб угля разного возраста и одна проба торфа. Образцы были взяты из месторождений Беларуси (табл. 1). Характеристика и датировка образцов проводились в Институте природопользования Национальной академии наук Беларуси. Образцы угля и торфа анализировали с использованием трех независимых методов: конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА-1) [11], двухэтапного иммуноферментного анализа (ИФА-2) [12] и тандемной высокоэффективной масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС–МС). На первой стадии эксперимента образцы угля (0.5 г) растирали и экстрагировали метанолом (3 мл) в течение 24 ч при комнатной температуре. Экстракты центрифугировали (3000 об/мин, 20 мин), жидкости супернатанта разбавляли буфером для анализа, проводили количественное определение БС по методу [12]. Полученные данные свидетельствуют о том, что все исследованные образцы содержали БС основных природных групп: 24-эпибрассинолида, брассинолида (кроме образца 2) и 28-гомобрассинолида (табл. 2).

Для детального изучения были выбраны образцы бурого угля 5 и 6, содержание всех групп БС в которых было наибольшим (как следует из табл. 2). Образцы угля (10 г) растирали и экстрагировали метанолом (35 мл) в течение 24 ч при комнатной температуре. Экстракты фильтровали на фильтре из пористого стекла. Полученные метанольные экстракты упаривали и остаток распределяли между циклогексаном (40 мл) и 80%-водным метанолом (3×15 мл). Объединенный 80%-ный водный экстракт упаривали до водного остатка, который распределяли между этилацетатом (40 мл) и 0.25 М Na_2HPO_4 (3×15 мл). Этилацетатную фракцию промывали водой (3×15 мл) и упаривали досуха. Остаток растворяли в метаноле (1.5 мл) и подвергали препаративной тонкослойной хроматографии (20×20 см) на силикагеле, используя смесь хлороформ–метанол (88 : 12)

Таблица 2. Содержание brassinosterоидов в образцах угля и торфа, измеренное с помощью ИФА-2

Образец №	Содержание БС (нг/г)		
	Группа 24-эпибрассинолида	Группа brassинолида	Группа 28-гомобрассинолида
1	6.74 ± 0.04	4.01 ± 0.10	3.41 ± 0.29
2	9.90 ± 1.02	не определяется	5.45 ± 0.96
3	17.20 ± 0.59	5.51 ± 0.54	4.60 ± 0.42
4	15.22 ± 2.36	7.42 ± 0.47	18.84 ± 0.50
5	17.58 ± 2.99	10.21 ± 0.68	60.84 ± 7.46
6	11.57 ± 1.78	29.96 ± 4.06	56.06 ± 11.10
7	37.20 ± 4.97	6.57 ± 0.44	10.50 ± 0.60

Таблица 3. Содержание БС (нг/г) в образцах бурого угля 5 и 6

№ п/п	БС	Метод анализа			
		ВЭЖХ–МС–МС		ИФА-1	
		5	6	5	6
1	кастастерон	0.97	0.41	4.19 ± 0.49	1.91 ± 0.21
2	24-кастастерон	2.51	3.24	8.89 ± 0.57	11.20 ± 1.04
3	24-эпибрассинолид	1.80	5.84	3.79 ± 0.99	9.42 ± 0.30
4	28-гомокастастерон	следы	следы	2.72 ± 0.035	1.62 ± 0.36
5	28-гомобрассинолид	не обнаружен	0.35	не обнаружен	0.275 ± 0.03
6	брасинолид	не обнаружен	не обнаружен	не обнаружен	не обнаружен

в качестве элюента. Зону, содержащую БС (R_f 0.4–0.6), собирали и элюировали метанолом, растворитель упаривали. Остаток растворяли в метаноле (300 мкл) и разделяли обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографией, используя 70%-водный ацетонитрил в качестве подвижной фазы со скоростью потока 1.5 мл/мин. УФ-детектирование проводили на длине волны 204 нм. Растворители перед использованием дегазировали. Фракции каждые 2 мин, начиная с 10 мин (10–12, 12–14, 14–16, 16–18, 18–20 мин), отдельно собирали и упаривали. Остаток растворяли в метаноле (3 мл) и аликвоту в 100 мкл упаривали, остаток растворяли в 0.5 мл буфера для анализа и использовали для ИФА-1 по методу [13]. Оставшуюся часть собранной фракции упаривали и использовали для анализа с помощью ВЭЖХ–МС–МС. Для ВЭЖХ–МС–МС использовался хроматограф Agilent 1200, оснащенный масс-спектрометром Agilent Triple Quad 6410. Все стандартные БС были количественно определены с помощью мониторинга множественных реакций (MRM) в положительном режиме. Результаты, полученные с помощью ИФА-1 и ВЭЖХ–МС–МС в образцах 5 и 6, представлены в табл. 3.

На основании полученных данных ИФА-1 и ВЭЖХ–МС–МС можно сделать вывод, что в образце 5 основными фракциями являются

24-эпибрассинолид (3.8 и 1.8 нг/г соответственно), 24-эпикастастерон (8.9 и 2.5 нг/г) и кастастерон (4.2 и 1.0 нг/г). Основными обнаруженными представителями БС в образце 6 являются также 24-эпибрассинолид (5.8 нг/г по данным ВЭЖХ–МС–МС и 9.4 нг/г по данным ИФА-1) и 24-эпикастастерон (3.2 и 11.2 нг/г), а также заметное количество кастастерона (1.9 и 0.4 нг/г). Представители группы 28-гомобрассинолида (28-гомокастастерон и 28-гомобрассинолид) были зарегистрированы в обоих образцах в небольших количествах или не обнаружены вовсе. Удивительным фактом является отсутствие (или наличие в недетектируемом количестве) brassинолида в изученных образцах угля, при этом его биосинтетический предшественник кастастерон был обнаружен двумя методами и в обоих образцах.

Следует отметить, что различия в результатах ИФА-2 и ИФА-1 связаны с разными методами пробоподготовки и, соответственно, степенью участия конкурирующих антигенов. В случае ИФА-2 результаты немного выше, потому что был проанализирован неочищенный экстракт, содержащий весь набор конкурирующих антигенов, включая другие БС. Более низкие результаты, полученные с помощью ИФА-1, обусловлены предварительным фракционированием сырого экстракта методом препаративной ВЭЖХ. В то же

время уровни стероидных гормонов растений, измеренные различными методами (ИФА-2, ИФА-1 и ВЭЖХ–МС–МС), сопоставимы, и использованная методология может быть применена к другим образцам минералов.

Таким образом, на основе изучения образцов угля и торфа мы можем сделать вывод, что эти минералы растительного происхождения содержат значительное количество БС, состав которых меняется в зависимости от отложений, глубины и других факторов. Количественное содержание БС сопоставимо с таковым в растительных объектах [14] и лекарственных травах [15].

Обнаружение brassinosteroidов в угольных месторождениях показывает уникальную стабильность этих молекул в различных условиях окружающей среды. Органические молекулы подобной структуры раньше никогда не находили в таких объектах, и их открытие приводит к нескольким важным выводам: 1) БС могут занимать место среди самых древних органических молекул, используемых Природой в качестве биорегуляторов; 2) если это так, то наследование отзывчивости к этим гормонам более молодыми организмами может быть объяснением множественных эффектов стероидных гормонов растений у животных и человека; 3) несмотря на сложную химическую структуру, БС очень стабильны в различных условиях, и, благодаря своей высокой активности, стимулирующей рост растений, могут являться важными компонентами, обеспечивающими эффективность широко используемых агропрепаратов на основе торфа; 4) заметный уровень содержания гормонов в отложениях — новое подтверждение растительного происхождения углей.

Результаты нашего исследования способствуют пониманию того факта, что молекулярная основа биорегуляторных механизмов очень консервативна, а стероидные гормоны, имеющие структуру, аналогичную современным, возможно, контролировали процессы роста, развития и адаптации растений на протяжении длительного периода эволюции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone // Hayat S., Ahmad A. (Eds.) Dordrecht: Springer, 2011. 462 p.
2. Belkhadir Y., Chory J. Brassinosteroid Signaling: A Paradigm for Steroid Hormone Signaling from the Cell Surface // Science. 2006. V. 314. № 5804. P. 1410–1411. <https://doi.org/10.1126/science.1134040>
3. Ahmed A.F., Hsieh Y.T., Wen Z.H., et al. Polyoxygenated Sterols from the Formosan Soft Coral *Sinularia gibberosa* // J. Nat. Prod. 2006. V. 69. № 9. P. 1275–1279. <https://doi.org/10.1021/np0601509>
4. Stonik V.A., Elyakov G.B. Secondary Metabolites from *Echinoderms* as Chemotaxonomic Markers // Bioorganic Marine Chemistry / Scheuer P.J. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. С. 43–86.
5. Del Rio J.C., Gonzalez-Vila F.J., Martin F. Variation in the Content and Distribution of Biomarkers in Two Closely Situated Peat and Lignite Deposits // Org. Geochem. 1992. V. 18. № 1. P. 67–78. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(92\)90144-M](https://doi.org/10.1016/0146-6380(92)90144-M)
6. Avsejs L.A., Nott C.J., Maxwell J.R., et al. Hydroxy and Ketonic Androstanes: A New Class of Sterol Diagenetic Product in Peat // Org. Geochem. 1998. V. 28. № 11. P. 749–753. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(98\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(98)00026-6)
7. Ortiz J.E., Gallego J.L. R., Torres T., et al. Palaeoenvironmental Reconstruction of Northern Spain during the last 8000 cal yr BP Based on the Biomarker Content of the Roñanzas Peat Bog (Asturias) // Org. Geochem. 2010. V. 41. № 5. P. 454–466. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.02.003>
8. Серебрянникова О.В., Стрельникова Е.Б., Преис Ю.И. и др. Состав экстрактивных веществ торфов осушенных и ненарушенных верховых болот Беларуси и Западной Сибири // Известия Томского политехнического университета. Химия и химические технологии. 2014. Т. 325. С. 31–45.
9. Shen Y., Thiel V., Duda J.-P., et al. Tracing the Fate of Steroids through a Hypersaline Microbial Mat (Kiritimati, Kiribati/Central Pacific) // Geobiology. 2018. V. 16. № 3. P. 307–318. <https://doi.org/10.1111/gbi.12279>
10. Гарецкий П.Г., Грибик Я.Г., Литвиновская Р.П., Савчук А.Л., Мардосевич М.А., Хрипач В.А. Стероидные гормоны растений — уникальные компоненты девонских нефтей Беларуси // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2020. Т. 494. С. 25–28. <https://doi.org/10.31857/S2686739720090078>
11. Khrupach V.A., Zhabinskii V.N., Litvinovskaya R.P. Immunoassays of Brassinosteroids // Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / Hayat S., Ahmad A. Dordrecht: Springer, 2011. С. 375–392.
12. Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., et al. A New ELISA for Quantification of Brassinosteroids in Plants // Steroids. 2015. V. 97. P. 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.022>
13. Хрипач В.А., Свиридов О.В., Прядко А.Г. и др. Иммуноферментный анализ (24R)-брасиностероидов // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. С. 371–378. <https://doi.org/10.1134/S1068162007030120>
14. Bajguz A., Tretyn A. The Chemical Characteristic and Distribution of Brassinosteroids in Plants // Phytochemistry. 2003. V. 62. № 7. P. 1027–1046. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00656-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00656-8)
15. Литвиновская Р.П., Савчук А.Л., Томанова М.А., Хрипач В.А. Содержание стероидных фитогормонов в некоторых лекарственных сборах // Химия природн. соед. 2019. № 5. С. 847–848. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02870-w>

STERIOD PHYTOHORMONES IN COAL DEPOSITS: A GEOCHEMICAL BRIDGE BETWEEN ANCIENT AND MODERN PLANTS

Foreign Member of the RAS **R. G. Garetsky^a, A. V. Baranovsky^b, V. N. Zhabinskii^b, R. P. Litvinovskaya^b,
A. G. Pryadko^c, A. L. Sauchuk^b, S. A. Fatykhava^b, V. A. Khripach^{b,#}, and P. S. Shabunya^b**

^a *Institute for Nature Management, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

^b *Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

^c *Hemma-Test Ltd., Minsk, Belarus*

[#] *E-mail: khripach@iboch.by*

Coal and peat samples of different ages were studied for the content of plant steroid hormones (brassinosteroids) using independently enzyme-linked immunosorbent assays and HPLC-MS/MS. Quantitative determination of brassinosteroids showed that all the studied samples contained hormones of the main natural groups (brassinolide type, 24-epibrassinolide type, and 28-homobrassinolide type), except for brassinolide in the oldest sample. The measured content of brassinosteroids was the same order that is typical for modern plant objects, and the composition of brassinosteroids varied depending on the occurrence depth and other factors. To the best of our knowledge, organic molecules of similar structure in coal deposits have never been found before, and present result may indicate a very high stability of the hormones and their assumed role of bioregulators throughout a long period of plant evolution from very ancient to modern forms.

Keywords: brassinosteroids, phytohormones, coal, peat, ELISA, HPLC-MS/MS