

WPŁYW SILDENAFILU I KWASU GIBERELINOWEGO NA KIEŁKOWANIE ZIARNIAKÓW JĘCZMIENIA ZWYCZAJNEGO (*HORDEUM VULGARE* L.)

Jan Bereda (Toruń)

Celem badań było przeanalizowanie wpływu sildenafilu na kiełkowanie ziarniaków jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) W przeprowadzonym eksperymencie analizowano wpływ 0,1 μM i 10 μM roztworu sildenafilu i kwasu giberelinowego na siłę i średni czas kiełkowania ziarniaków jęczmienia zwyczajnego. Ziarniaki umieszczono na pożywkach $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog), zawierających roztwory sildenafilu w DMSO (dimetylosulfotlenku) oraz kwas giberelinowy w stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zastosowanie sildenafilu w stężeniu 0,1 μM znacznie zwiększa siłę kiełkowania oraz skraca średni czas kiełkowania. Jednakże nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w średnim czasie kiełkowania pomiędzy zastosowanymi stężeniami sildenafilu 0,1 μM i 10 μM .

Wstęp

Sildenafil jest substancją czynną wielu leków stosowanych w leczeniu zaburzeń erekcji. Został on odkryty w 1989 roku w trakcie badań prowadzonych przez koncern Pfizer nad lekiem na dławicę piersiową [5]. Sildenafil w organizmie ludzkim powoduje rozkurcz mięśni gładkich, dlatego znalazł również zastosowanie w leczeniu nadciśnienia płucnego [16]. Jego mechanizm działania oparty jest o inhibicję fosfodiesterazy typu 5, enzymu metabolizującego cGMP (cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan) [4]. cGMP jest ważnym przekaźnikiem wtórnym spotykanym w szlakach transdukcji sygnału, zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych [12]. Długość oraz siła odpowiedzi na cGMP jest zależna od jego stężenia w komórce zwierzęcej, które regulowane jest przez działanie dwóch enzymów cyklicznej guanylanowej oraz fosfodiesterazy. Cykliczna guanylanowa katalizuje syntezę cGMP z GTP (guanozyno-5'-trifosforanu), a fosfodiesteraza odpowiada za rozkład cGMP do GMP (guanozyno-5'-monofosforanu).

W odróżnieniu od modelu zwierzęcego, mechanizm terminacji sygnału cGMP u roślin nie został w pełni poznany. Pomimo tego, że aktywność analogicznej do zwierzęcej fosfodiesterazy została w komórkach roślinnych dostrzeżona, nie zidentyfikowano konkretnych białek odpowiedzialnych za tę funkcję [8]. Jednakże na obecność fosfodiesterazy u roślin może wskazywać to, że po dodaniu jej inhibitorów używanych u innych eukariotów następuje akumulacja cGMP [7,14].

W ostatnich dekadach wykazano istotne znaczenie cGMP w wielu procesach fizjologicznych roślin. Jest on głównie zaangażowany w procesy regulowane przez fitohormony. Co ciekawe, cGMP jest zaangażowany w procesy przeciwstawne sobie, takie jak: indukowane auksynami otwieranie aparatów szparkowych i indukowane kwasem abscysynowym zamykanie szparek [1,3]. Reguluje również aktywność kanałów jonowych i proces kwitnienia [13]. Udowodniono, że cGMP jest niezbędny do prawidłowego kiełkowania nasion [14]. Wykazano ponadto, że cGMP jest obecny w szlakach transdukcji zależnych od kwasu giberelinowego, prowadzących do syntezy

α -amylazy w obrębie warstwy aleuronowej ziarniaków jęczmienia zwyczajnego [11]. Enzym ten jest odpowiedzialny za katalizowanie hydrolizy skrobi w obrębie bielma, co umożliwia nasionom kiełkowanie.

Wykorzystanie medyczne na dużą skalę sildenafilu powoduje jego znaczną akumulację w środowisku. Substancja ta badana pod kątem fitotoksyczności powodowała niejednakowy wpływ na organizm roślinny. Efekt jej działania był inny dla różnych gatunków roślin, jednakże z danych literaturowych można wnioskować, że hamuje ona kiełkowanie w wyższych stężeniach, a w niższych indukuje [2].

Jako obiekt badań wybrano ziarniaki jęczmienia zwyczajnego (*H. vulgare* L.), ponieważ znaczna część dotychczasowych badań dotyczących roli cGMP w szlakach zależnych od kwasu giberelinowego została przeprowadzona na ziarniakach tej rośliny uprawnej [11, 6].

Celem eksperymentu było zbadanie wpływu sildenafilu na indukowane kwasem giberelinowym kiełkowanie nasion. Założono, że w związku z inhibicją fosfodiesterazy rozkład cGMP, zsyntezowanego w wyniku działania kwasu giberelinowego [11], ulegnie zahamowaniu, co spowoduje reakcję ziarniaków na kwas giberelinowy i w konsekwencji przyspieszy kiełkowanie.

Zmienną niezależną stanowiło stężenie sildenafilu w pożywce zawierającej kwas giberelinowy, a zmienną zależną liczba wykiełkowanych ziarniaków. Jako hipotezę obrano stwierdzenie: sildenafil w obecności kwasu giberelinowego wpływa stymulująco na kiełkowanie ziarniaków jęczmienia zwyczajnego poprzez skrócenie ich średniego czasu kiełkowania i zwiększenie siły kiełkowania.

Materiały i metody

Eksperyment przeprowadzono na ziarniakach jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) pozyskanych od Rolnas sp. z o.o. Aby zapobiec infekcji grzybowej, ziarniaki wysterylizowano za pomocą 0,25% roztworu podchlorynu sodu (producent Chempur) i 0,02% roztworu Tritonu (R) X-100 (Chempur) przez 15 min. Następnie przepłukano 3-krotnie używając wody destylowanej. Po sterylizacji ziarniaki umieszczono na 16 szalkach Petriego na pożywce $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog) [10] (East Syntex) o objętości 40 ml, bez sacharozy, pH 5,8, agar w stężeniu 8%. Ze względu na brak dostępu do autoklawu, pożywka została wysterylizowana w kuchence mikrofalowej (firmy Zelmer 29Z022) 900 W/ 200 ml pożywki przez 4 min [15]. Szalki uszczelniono przylepcem włókninowym przepuszczalnym dla gazów i umieszczono

w temperaturze 21°C, w warunkach oświetlenia 16 godzin światła/ 8 godzin ciemności.

Sildenafil (Glentham Life Sciences Ltd) rozpuszczono w DMSO (Biomus) w celu otrzymania roztworu bazowego o stężeniu $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do pożywki dodawano odpowiednie objętości roztworu bazowego, aby uzyskać pożądane stężenia sildenafilu w poszczególnych próbie. Pożywki, na których umieszczono ziarniaki wchodzące w skład prób badawczych, zawierały sildenafil w stężeniach $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 μM) i $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (0,1 μM) oraz kwas giberelinowy w stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (East Syntex). Aby osiągnąć dwa różne stężenia sildenafilu, do pożywki dodano różne objętości roztworu bazowego, co spowodowało odmienną zawartość DMSO (w którym sildenafil był rozpuszczony) w podłożu. Zastosowano więc dwie próby kontrolne zawierające: 0,01% i 1% (procent objętościowy) DMSO w pożywce, co odpowiadało ilości DMSO znajdującej się w odpowiadających próbach badawczych, oraz kwas giberelinowy w stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Każda z prób liczyła 25 ziarniaków. Na jednej szalce znajdowały się ziarniaki wchodzące w skład jednej próby. Eksperyment przeprowadzono w czterech równoległych powtórzeniach ($n=4$).

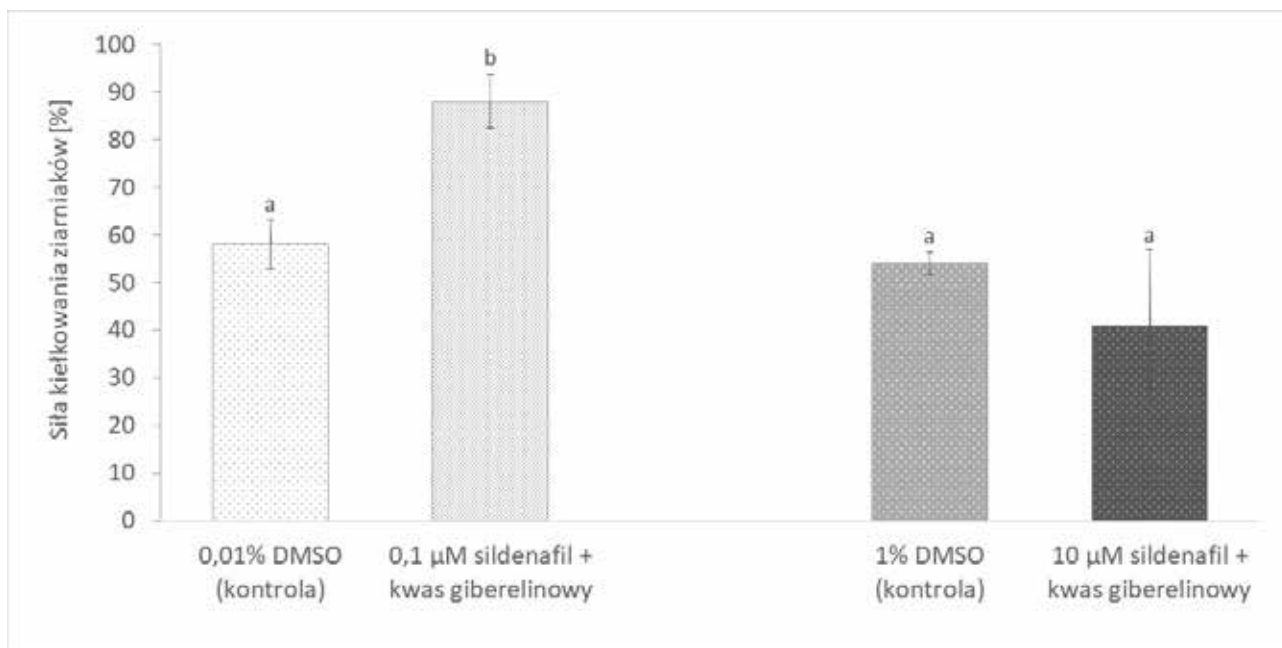
Wykiełkowane ziarniaki zliczano co 12 godz. przez 7 dni. Kiełkowanie zdefiniowano jako wyłonienie się koleoptylu nie krótszego od długości ziarniaka.

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Microsoft Excel 2016 oraz R 3.6.1. Obliczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, przeprowadzono test Shapiro-Wilka oraz test homogeniczności wariancji Levene'a. W związku z niespełnieniem wymagań do przeprowadzenia jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, przeprowadzono test nieparametrycznej analizy wariancji Kruskala-Wallisa oraz test *post-hoc* Dunna [9]. Przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$.

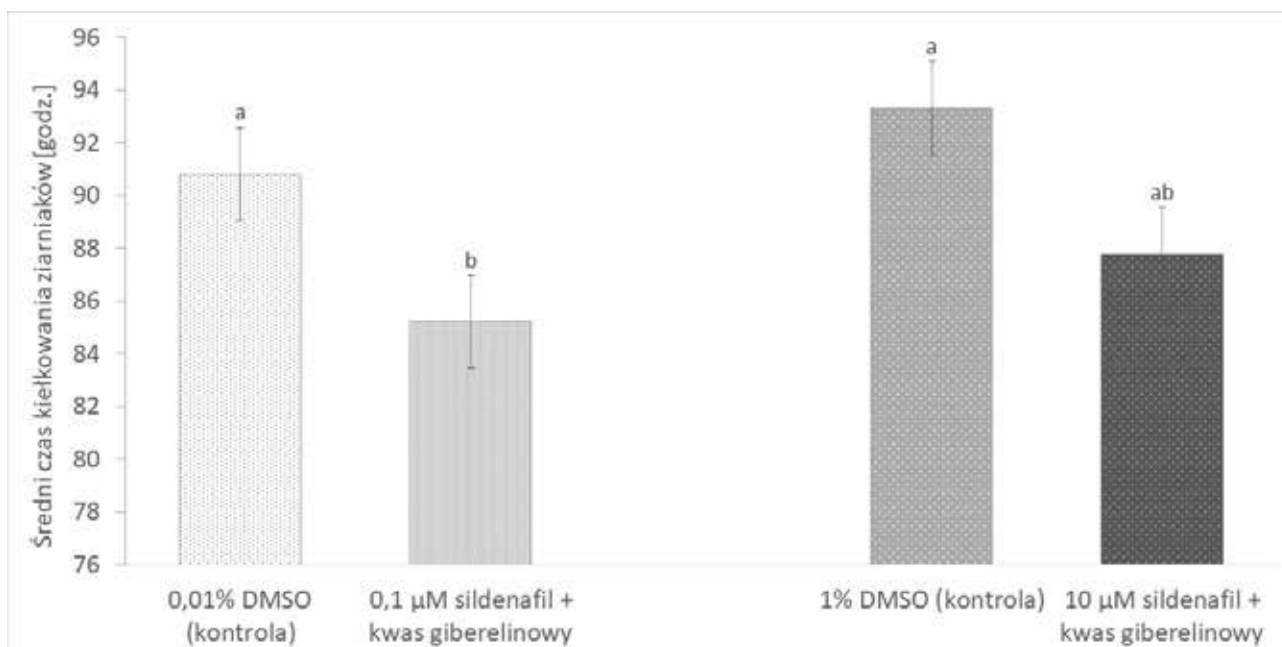
Uzyskane wyniki standaryzowano do dwóch wskaźników: średniego czasu kiełkowania (ang. *average germination time*, AGT) oraz siły kiełkowania (ang. *germination capacity*, GC), opisanych wzorami:

$$\text{AGT[h]} = \frac{\sum n_i \cdot i}{\sum n_i} \quad \text{GC[\%]} = \left(\frac{\sum n_i}{N} \right) \cdot 100\%$$

n_i – liczba ziarniaków, które wykiełkowały w i -tej godzinie, N – liczba ziarniaków w próbie,



Ryc. 1. Siła kiełkowania ziarniaków (GC) jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w zależności od zastosowanych stężeń DMSO (kontrola) i sildenafilu, w pożywce zawierającej kwas giberelinowy o stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na figurze zaznaczono odchylenie standardowe. Brak istotności statystycznej (test Dunna) pomiędzy próbkami oznaczono tą samą literą; $n=4$



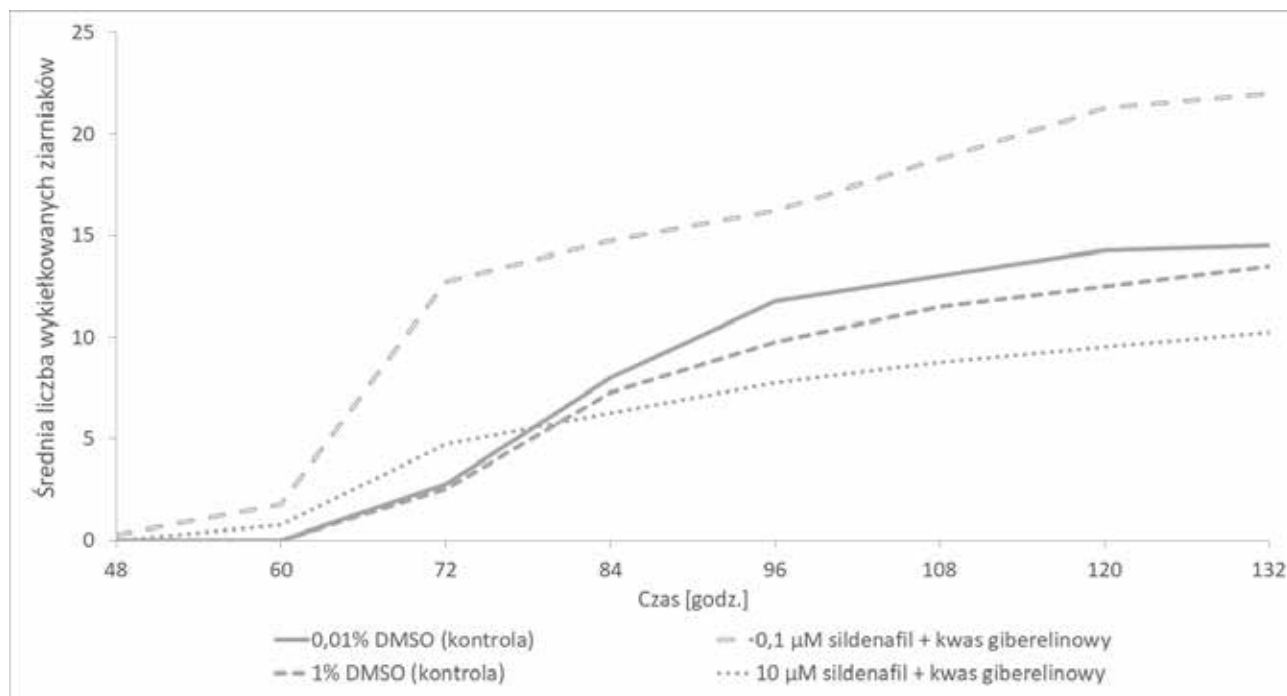
Ryc. 2. Średni czas kiełkowania ziarniaków (AGT) jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w zależności od zastosowanych stężeń DMSO (kontrola) i sildenafilu, w pożywce zawierającej kwas giberelinowy o stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na figurze zaznaczono odchylenie standardowe. Brak istotności statystycznej (test Dunna) pomiędzy próbkami oznaczono tą samą literą; $n=4$

Wyniki

Wartości GC przedstawiono na Ryc. 1. Test nieparametrycznej analizy wariancji Kruskala-Wallis wykazał istotność statystyczną różnic pomiędzy próbkami ($p = 0,0146$, $df = 3$). Przeprowadzony test *post-hoc* Dunna wskazał istotne różnice w sile kieł-

kowania pomiędzy ziarniakami znajdującymi się na pożywce zawierającej sildenafil w stężeniu $0,1 \mu\text{M}$ i kwas giberelinowy a pozostałymi próbkami.

Na Ryc. 2. przedstawiono wartości średniego czasu kiełkowania. Przeprowadzony test Kruskala-Wallis wykazał istotne statystycznie różnice pomiędzy próbkami ($p = 0,00365$, $df = 3$). Test Dunna wskazał istotne różnice AGT pomiędzy ziarniakami



Ryc. 3. Średnia liczba wykiełkowanych ziarniaków jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w kolejnych godzinach obserwacji w zależności od zastosowanych stężeń DMSO (próby kontrolne) i sildenafilu (próby badawcze), w pożywce zawierającej kwas giberelinowy o stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $n=4$

znajdującymi się na pożywce zawierającej sildenafil w stężeniu $0,1 \mu\text{M}$ i kwas giberelinowy, a próbami kontrolnymi.

Dyskusja

Zastosowanie większego stężenia sildenafilu ($10 \mu\text{M}$) powoduje zmniejszenie siły kiełkowania w porównaniu do mniejszego stężenia ($0,1 \mu\text{M}$) (Fig. 1). Jednakże nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy próbą obejmującą ziarniaki umieszczone na pożywce zawierającej kwas giberelinowy z dodatkiem sildenafilu (w stężeniu $10 \mu\text{M}$) a próbą kontrolną. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że sildenafil w stężeniu $0,1 \mu\text{M}$ w obecności kwasu giberelinowego znacznie zwiększa siłę kiełkowania ziarniaków jęczmienia zwyczajnego (Ryc. 1). Podobną zależność można dostrzec we wspomnianej już publikacji D'Abrosca i współpracowników [2], gdzie wykazano, że w niższych stężeniach sildenafil powoduje zwiększenie siły kiełkowania, zaś w wyższych powoduje zmniejszenie tej wartości. Można jedynie nakreślić ogólną tendencję. Nie ma możliwości wskazania dokładnych stężeń, ponieważ efekt, który powodował sildenafil w danym stężeniu, był odmienny dla różnych gatunków badanych roślin. Należy pamiętać, że przeprowadzone eksperymenty dotyczyły wpływu roztworów sildenafilu i kwasu giberelinowego na kiełkowanie,

dlatego nie można dokładnie porównywać otrzymanych wyników z opublikowanymi w cytowanej pracy, które dotyczą jedynie wpływu samego sildenafilu (w postaci cytrynianu sildenafilu).

Nie odnaleziono w dostępnej literaturze jakiegokolwiek wytłumaczenia tej zależności. Wydaje się prawdopodobne, że odpowiedzialne za spadek siły kiełkowania przy zastosowaniu wyższych stężeń sildenafilu mogą być jego metabolity, których poziom rośnie wraz ze zwiększaniem stężenia sildenafilu. Być może dokładne poznanie mechanizmu metabolizmu sildenafilu u roślin i zbadanie fitotoksyczności jego metabolitów może okazać się kluczowe w wytłumaczeniu tego problemu.

Otrzymane wartości średniego czasu kiełkowania w odniesieniu do wyników siły kiełkowania wydają się być bardzo interesujące. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy wartości AGT pomiędzy próbami badawczymi (Ryc. 2). Zależność tą dobrze obrazuje Ryc. 3. przedstawiająca średnią liczbę wykiełkowanych ziarniaków w danych próbach w przedziałach czasowych. Można zauważyć, że w obu próbach badawczych około połowa skiełkowanych ziarniaków wykiełkowała do 72 h obserwacji, co tłumaczy tak zbliżone wartości AGT. Na figurze tej widoczne są również znaczne różnice w średniej liczbie wykiełkowanych ziarniaków po 132 godzinach, co tłumaczy tak odmienne wartości GC. Jednakże, pomimo braku istotnej statystycznie różnicy wartości

AGT pomiędzy próbami badawczymi, występuje ona pomiędzy próbą badawczą zawierającą sildenafil w mniejszym stężeniu a próbą kontrolną, dlatego uprawniony jest wniosek, że sildenafil w stężeniu 0,1 μM w obecności kwasu giberelinowego skraca średni czas kiełkowania ziarniaków jęczmienia zwyczajnego.

Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że w odpowiednim stężeniu sildenafil w obecności kwasu giberelinowego stymuluje kiełkowanie poprzez znaczne zwiększenie siły kiełkowania ziarniaków oraz skrócenie jego średniego czasu. Badana metoda zwiększenia wydajności kiełkowania mogłaby

znaleźć zastosowanie praktyczne tam, gdzie mamy do czynienia z cennym materiałem nasiennym o małej sile kiełkowania, jednakże musiałyby to zostać poprzedzone badaniami w celu dobrania optymalnego stężenia sildenafilu dla każdego gatunku uprawianej rośliny, ponieważ może ono się różnić. Należy również przeprowadzić badania w celu dokładnego poznania produktów metabolizmu sildenafilu u roślin. Potencjalnie mogłyby one wywoływać działanie fitotoksyczne. Poprzez ściekanie wraz z wodą z pól mogłoby dochodzić do ich akumulacji, co stworzyłoby zagrożenie dla środowiska naturalnego.

Bibliografia

1. Cousson A (2003). Pharmacological evidence for a positive influence of the cyclic GMP-independent transduction on the cyclic GMP-mediated Ca^{2+} - dependent pathway within *Arabidopsis* stomatal opening in response to auxin. *Plant Science* 164: 759–767.
2. D'Abrosca B, Fiorentino A, Izzo A, Cefarelli G, Pascarella MT, Uzzo P, Monaco P (2008). Phytotoxicity evaluation of five pharmaceutical pollutants detected in surface water on germination and growth of cultivated and spontaneous plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43: 285–294.
3. Dubovskaya LV, Bakakina YS, Kolesneva EV, Sodel DL, McAinsh MR, Hetherington AM, Volotovskii ID (2011). cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive *Arabidopsis* mutant *abi1-1*. *New Phytologist* 191: 57–69.
4. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burhess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* 353: 2148–57.
5. Goldstein I, Burnett AL, Rosen RC, Park PW, Stecher VJ (2019) The serendipitous story of sildenafil: an unexpected oral therapy for erectile dysfunction. *Sexual Medicine Reviews* 7: 115–128.
6. Gomez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho THD (2001). Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *The Plant Cell* 13: 667–679.
7. Ishioka N, Tanimoto S (1990) Involvement of cyclic AMP in adventitious bud initiation of *Torenia* stem segments. *Plant & Cell Physiology* 31: 91–97.
8. Isner JC, Maathuis FJM (2011) Measurement of cellular cGMP in plant cells and tissues using the endogenous fluorescent reporter FlincG. *The Plant Journal* 65: 329–334.
9. Łomnicki A (2003). Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Warszawa: PWN.
10. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–97.
11. Penson SP, Schuurink RC, Fath A, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (1996). cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *The Plant Cell* 8: 2325–33.
12. Reggiani R (1997). Alteration of levels of cyclic nucleotides in response to anaerobiosis in rice seedlings. *Plant & Cell Physiology* 38: 740–742.
13. Szmidt-Jaworska A, Jaworski K, Kopcewicz J (2007). Involvement of cyclic GMP in phytochrome controlled flowering of *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Physiology* 165: 858–867.
14. Teng Y, Xu W, Ma M (2008). cGMP is required for seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 167: 885–889.
15. Vora N, Jasrai Y (2012). Microwave oven based sterilization of media for micro propagation of banana. *Cibtech Journal of Biotechnology* 1: 2–3.
16. Wang YH, Gehring C, Irving HR (2011) Plant natriuretic peptides are apoplastic and paracrine stress response molecules. *Plant & Cell Physiology* 52: 837–850.