

УДК 581.1

АФК-ЗАВИСИМОЕ ИНДУЦИРОВАНИЕ ГЕМИНОМ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2021 г. Ю. Е. Колупаев^{а, *}, М. А. Шкляревский^а, Ю. В. Карпец^а,
Н. В. Швиденко^а, А. А. Луговая^а

^аХарьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 29.05.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 18.06.2020 г.

Исследовано влияние 24-часовой обработки гемином (донором монооксида углерода – СО, образующегося с участием гемоксигеназы) на теплоустойчивость проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и процессы образования и обезвреживания АФК. Установлено, что обработка проростков гемином в диапазоне концентраций 0.5–10 мкМ вызвала повышение их устойчивости к повреждающему прогреву (45°C, 10 мин). Наибольший эффект проявлялся под влиянием 5 мкМ гемина. При обработке гемином отмечалось транзитное увеличение в корнях активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода. Эффект повышения содержания H₂O₂ не проявлялся в присутствии его скавенджера диметилтиомочевина (ДМТМ), а также при обработке корней проростков поглотителем СО гемоглобином и ингибитором внеклеточной пероксидазы азидом натрия, но не ингибитором НАДФ·Н-оксидазы имидазолом. Поскольку при разложении гемина образуются редокс-активные ионы Fe²⁺, для проверки специфичности его действия как донора СО сравнивали эффекты гемина с влиянием 5 мкМ FeSO₄. Сульфат железа в исследуемой концентрации не оказывал влияния на генерацию пероксида водорода корнями и активность внеклеточной пероксидазы. Через 24 ч после начала обработки гемином в корнях увеличивалась активность супероксиддисмутазы, каталазы и внутриклеточной пероксидазы. Вызываемые гемином эффекты повышения активности антиоксидантных ферментов не проявлялись в присутствии ДМТМ, а обработка корней проростков FeSO₄ не влияла на их активность. Под действием донора СО после повреждающего прогрева также снижался выход из корней проростков соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра. Положительное влияние гемина на теплоустойчивость проростков устранялось скавенджером СО гемоглобином и поглотителем пероксида водорода ДМТМ. Обработка проростков FeSO₄ не влияла на их выживание после прогрева. Предполагается участие пероксида водорода как сигнального посредника в реализации влияния донора СО на антиоксидантную систему проростков пшеницы и их теплоустойчивость.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, монооксид углерода, гемин, теплоустойчивость, пероксид водорода, антиоксидантная система

DOI: 10.31857/S0015330321010097

ВВЕДЕНИЕ

Формирование адаптивных реакций растений на действие стрессоров происходит с участием сети сигнальных посредников, среди которых важное место принадлежит газотрансмиттерам [1–3]. Помимо интенсивно исследуемых в настоящее время монооксида азота (NO) и сероводорода (H₂S), в процессах адаптации растений задействован мо-

нооксид углерода (СО) [1], функции которого исследованы слабо.

В растительных клетках, как и животных, монооксид углерода образуется преимущественно с помощью гемоксигеназы (К.Ф. 1.14.99.3), которая в присутствии молекул кислорода и НАДФ·Н катализирует деградацию гема до биливердина IX α с высвобождением СО и ионов Fe²⁺ [4]. Среди четырех обнаруженных у растений генов гемоксигеназы наиболее интенсивно экспрессируется *HO1*. Именно экспрессия гена гемоксигеназы-1 обычно усиливается в стрессовых условиях, в частности,

Сокращения: ДМТМ – диметилтиомочевина, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, СОД – супероксиддисмутазы.

при обезвоживании [5], засолении [6] и гипертермии [7]. Действие этих стрессоров вызывает и увеличение эндогенного содержания СО в растительных объектах.

В ряде работ изучено влияние экзогенного монооксида углерода на устойчивость растений и функционирование протекторных систем при действии стрессоров различной природы. Для таких исследований обычно используют доноры СО, которые являются искусственными субстратами гемоксигеназы, в частности, гематин [8] и гемин [9]. Так, показано, что обработка гематином способствовала прорастанию семян пшеницы при действии 25% ПЭГ-6000 [5]. При этом происходило увеличение активности амилазы и антиоксидантных ферментов. Гематин вызывал повышение солеустойчивости *Cassia obtusifolia*, что выражалось в нормализации функционирования фотосинтетического аппарата в стрессовых условиях, уменьшении окислительных повреждений, усилении накопления пролина и сахаров, а также увеличении активности ключевых антиоксидантных ферментов [10]. У растений риса, подвергнутых токсическому действию цинка, при обработке геминотом отмечалось смягчение ингибирования роста и угнетение экспрессии генов транспортеров цинка *OsZIPs*, что приводило к уменьшению его накопления в органах растений [9].

В настоящее время среди экологических стрессоров действие высоких температур считается одним из наиболее вредоносных [11]. Согласно современным климатическим моделям, потери урожая сельскохозяйственных растений, связанные с тепловым стрессом, в ближайшие десятилетия увеличатся до 40% [12]. В качестве перспективных приемов, индуцирующих теплоустойчивость растений, рассматривается и обработка донорами газотрансмиттеров [11, 13]. Однако роль СО в адаптации растений к экстремальным температурам изучена очень слабо, хотя такие сведения важны не только для решения прикладных задач, но и для понимания фундаментальных механизмов теплоустойчивости.

Показано увеличение эндогенного содержания СО в клетках табака при гипертермии [7], а также повышение их выживания при добавлении в среду гематина [8]. Данные же о влиянии доноров СО на теплоустойчивость интактных растений отсутствуют.

Совершенно не ясным остается и вопрос о том, какие посредники участвуют в реализации протекторных эффектов экзогенного СО при гипертермии. Известно, что АФК как сигнальные посредники задействованы в формировании устойчивости при тепловом закаливании растений, с их участием происходит активация систем, предотвращающих развитие окислительного стресса [14, 15]. Имеются и немногочисленные данные, указывающие на роль АФК в реализации отдельных фи-

зиологических эффектов монооксида углерода. Так, показано, что вызываемое экзогенным СО либо его донорами закрытие устьиц у бобов зависит от АФК, образующихся с участием НАДФ·Н-оксидазы [16]. С другой стороны, ростстимулирующее влияние экзогенного СО на корни пшеницы угнетается антиоксидантами и салицилгидроксамовой кислотой — ингибитором пероксидазы, что указывает на возможную роль этого фермента в образовании АФК растительными клетками при действии монооксида углерода [17].

В целом же, феноменология эффектов СО при гипертермии и участие в их реализации АФК как сигнальных посредников остаются практически неизученными. В связи с этим, цель работы состояла в изучении роли АФК и ферментативной антиоксидантной системы в проявлении предполагаемого влияния донора СО гемина на теплоустойчивость проростков пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 4-суточные этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, выращенные при температуре 18–20°C на водопроводной воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратноосмотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. В среду инкубации корней добавляли гемин в концентрациях диапазона 0.05–50 мкМ и выдерживали проростки в течение 24 ч. Оптимальная экспозиция была выбрана в предварительных опытах.

При изучении влияния скавенджера СО гемоглобина (10 мкМ) [18], ингибиторов пероксидазы азидата натрия (NaN_3 , 1 мМ) [19], НАДФ·Н-оксидазы имидазола (10 мкМ) [20], скавенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ — 150 мкМ) [21] инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке совместного действия гемина и указанных антагонистов последние добавляли в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее гемина. Концентрации исследуемых соединений выбирали на основании предварительных опытов. В ряде экспериментов также сравнивали влияние 5 мкМ гемина с действием FeSO_4 в эквимольной концентрации, время инкубации проростков на растворах составляло 24 ч.

Для определения теплоустойчивости проростков их подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. После этого проростки всех вариантов переносили на очищенную водопроводную воду. Через 3 сут оценивали относительное количество выживших проростков [15].

Все биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чув-

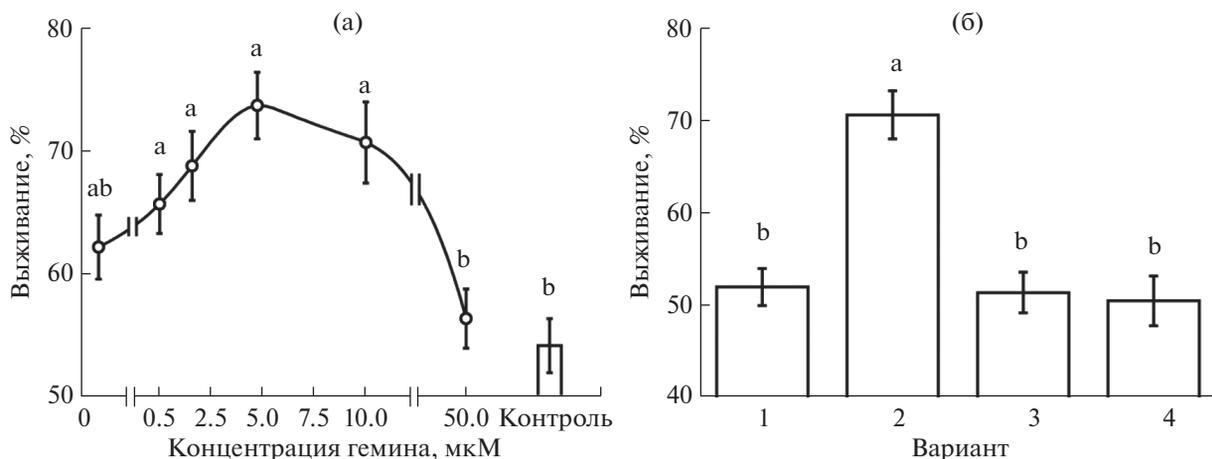


Рис. 1. Влияние гемина на выживание (%) проростков пшеницы после 10-минутного повреждающего прогрева при 45°C: а – концентрационная зависимость протекторного эффекта гемина; б – нивелирование эффекта гемина скавенджером СО гемоглобином: 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами отмечены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

ствительны к воздействиям экзогенных соединений [22]. Активность внеклеточной пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7) определяли в корнях проростков путем получения экстраклеточного раствора [19]. Для этого корни исследуемых интактных проростков помещали в стаканчики с дистиллированной водой, рН которой при необходимости доводили до 6.2 с помощью NaOH. Через 20 мин проростки извлекали, корни отсекали, аккуратно обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали, а в инкубационной среде определяли активность фермента по реакции окисления гваякола пероксидом водорода [19].

Для определения содержания пероксида водорода корни на холоде гомогенизировали в 5% трихлоруксусной кислоте. Пробы центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при температуре 2–4°C на центрифуге MPW 350R ("MPW Med Instruments", Польша) и в супернатанте определяли концентрацию H_2O_2 с помощью ферротрицианидного метода [23].

При определении активности антиоксидантных ферментов навески корней гомогенизировали на холоде в 0.15 М К, Na-фосфатном буфере (рН 7.6), содержащем ЭДТА (0.1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ) [22]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при рН 7.6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАД·Н и феназинметосульфата. Активность каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) анализировали при рН 7.0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Актив-

ность растворимой внутриклеточной ПО определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. Активность СОД выражали в усл. ед./г сырой массы мин), КАТ – в ммоль H_2O_2 /г сырой массы мин), ПО – в мкмоль гваякола/г сырой массы мин).

Состояние мембран клеток корней оценивали через 24 ч после повреждающего прогрева по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (преимущественно свободных нуклеотидов) [24]. Корни интактных проростков погружали в стаканчики с дистиллированной водой на 1 ч, после чего отсекали от проростков и взвешивали. Оптическую плотность инкубационного раствора определяли при A_{252} и A_{264} на спектрофотометре СФ 46 ("ЛОМО", Россия). Выход веществ рассчитывали в условных единицах как отношение усредненной величины, измеренной при указанных длинах волны, к массе корней и выражали в процентах к величинам, вычисленным для корней проростков, не подвергнутых повреждающему прогреву.

Опыты проводили в 4–5-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизвели 3 раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий определяли с помощью дисперсионного анализа. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются эффекты, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка геминем повышала выживание проростков пшеницы после повреждающего прогрева (рис. 1а). Тенденция к повышению теплоустойчивости проростков отмечалась при воздействии ми-

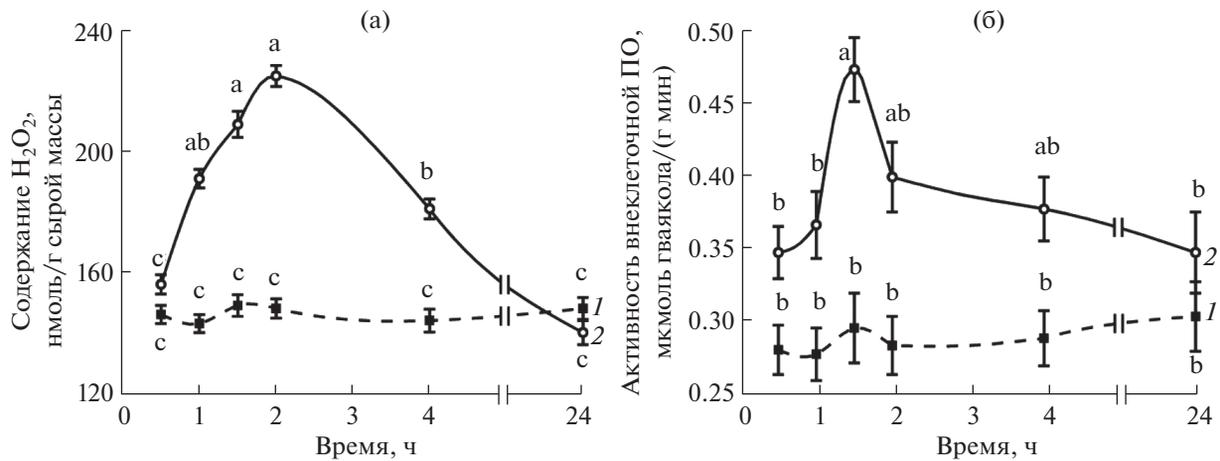


Рис. 2. Динамика содержания пероксида водорода (а) и активности внеклеточной ПО (б) в корнях проростков пшеницы. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

нимальной исследуемой концентрации – 0.05 мкМ. Достоверный эффект наблюдался при использовании донора СО в концентрациях диапазона 0.5–10 мкМ. Более высокая концентрация гемина (50 мкМ) защитного действия не оказывала. В дальнейших экспериментах гемин использовался в концентрации 5 мкМ, которая была наиболее эффективной.

Обработка проростков гемоглобином не влияла на их теплоустойчивость (рис. 1б). При этом гемоглобин, обладающий способностью связывать СО, в комбинации с гемом полностью устранял стресс-протекторное действие последнего. Этот результат в определенной степени указывает на специфичность действия гемина как донора монооксида углерода.

Уже через 1 ч после начала инкубации проростков в присутствии гемина в их корнях отмечалось заметное повышение содержания пероксида водорода (рис. 2а). Его количество достигало максимума к 2 ч наблюдений, затем постепенно снижалось и через 24 ч возвращалось к значениям контроля.

Тенденция к увеличению активности внеклеточной ПО в корнях наблюдалась уже через 30 мин после начала инкубации (рис. 2б), однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$. Наиболее существенное повышение активности фермента отмечалось через 1.5 ч от начала воздействия гемина, затем активность фермента немного снижалась, а через 24 ч инкубации почти не отличалась от контроля.

Обработка проростков гемоглобином существенно не влияла на содержание пероксида водорода в корнях, хотя и вызывала незначительное повышение активности внеклеточной ПО (рис. 3). При этом гемоглобин полностью устранял вызы-

ваемый обработкой гемом эффект повышения содержания H₂O₂ и в значительной степени нивелировал увеличение активности внеклеточной ПО, происходящее в присутствии донора СО.

Как уже отмечалось, при разложении гемина гемоксигеназой наряду с СО образуются ионы Fe²⁺, отличающиеся редокс-активностью. В связи с этим, для дополнительного подтверждения связи эффектов гемина именно с образованием СО сравнивали его влияние на содержание пероксида водорода и активность внеклеточной ПО с действием FeSO₄. Сульфат железа в концентрации, эквивалентной концентрации гемина, не оказывал влияния ни на содержание H₂O₂ в корнях, ни на активность внеклеточной ПО (рис. 3).

Как и следовало ожидать, обработка проростков ингибитором ПО азидом натрия снижала активность внеклеточной формы фермента. При этом под действием NaN₃ полностью устранялось повышение активности ПО, вызываемое донором СО (рис. 3б). Также азид натрия снижал содержание пероксида водорода в корнях и полностью устранял его повышение в присутствии гемина (рис. 3а). В то же время ингибитор НАДФ·Н-оксидазы имидазол практически не влиял на вызываемый донором СО эффект повышения содержания H₂O₂ в корнях.

В присутствии скавенджера пероксида водорода ДМТМ его содержание в корнях снижалось, также при обработке ДМТМ не регистрировалось повышение содержания пероксида водорода в варианте с гемом (рис. 3а).

В целом, полученные результаты указывают, что гемин, действуя как донор СО, оказывал достаточно специфическое влияние на генерацию пероксида водорода корнями проростков пшени-

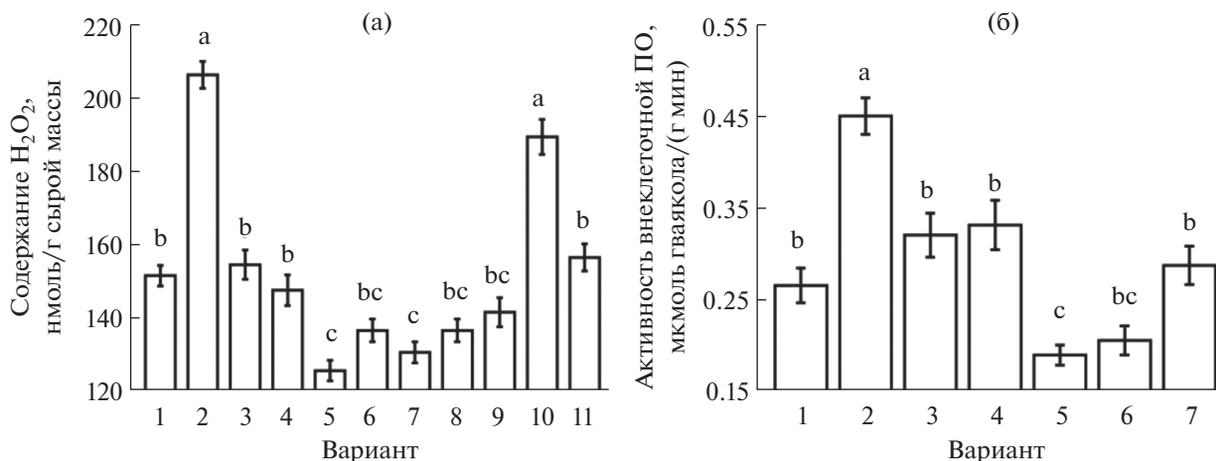


Рис. 3. Влияние гемина, гемоглобина, ДМТМ, азид натрия, имидазола и $FeSO_4$ на содержание пероксида водорода (а) и активность внеклеточной ПО (б) в корнях пшеницы. (а): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ); 5 – ДМТМ (150 мкМ); 6 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 7 – азид натрия (1 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + азид натрия (1 мМ); 9 – имидазол (10 мкМ); 10 – гемин (5 мкМ) + имидазол (10 мкМ); 11 – $FeSO_4$ (5 мкМ); (б): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ); 5 – азид натрия (1 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + азид натрия (1 мМ); 7 – $FeSO_4$ (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 2 ч после начала обработки геминном и/или через 4 ч от начала обработки другими соединениями, активность внеклеточной пероксидазы анализировали через 1.5 ч после начала действия гемина и/или через 3.5 ч после начала обработки другими соединениями.

цы. Этот эффект, по всей вероятности, обусловлен повышением активности внеклеточной ПО, которая может генерировать АФК, в том числе пероксид водорода (рис. 2, 3).

В связи с обнаруженным влиянием донора СО на генерацию АФК оценивали его действие и на активность ключевых антиоксидантных ферментов. При обработке геминном в корнях постепенно, к 24 ч наблюдений, повышалась активность СОД (рис. 4а). Аналогичным образом изменялась активность КАТ (рис. 4б) и растворимой ПО (рис. 4в).

Для доказательства причинно-следственной связи между вызываемым обработкой геминном повышением содержания пероксида водорода в корнях и увеличением активности антиоксидантных ферментов оценивали влияние донора СО на их активность в присутствии скавенджера H_2O_2 ДМТМ. Обработка этим соединением сама по себе не влияла на активность СОД, но устраняла ее повышение, вызываемое действием гемина (рис. 5а).

Через 24 ч после повреждающего прогрева в контроле активность СОД не изменялась, а в варианте с геминном несколько снижалась. В вариантах с ДМТМ и его комбинацией с геминном активность СОД после повреждающего прогрева существенно не изменялась. Обработка проростков сульфатом железа не влияла на активность СОД как до, так и после повреждающего прогрева (рис. 5а).

В присутствии ДМТМ активность КАТ в корнях не изменялась, при этом скавенджер пероксида водорода устранял ее повышение, вызываемое обработкой геминном (рис. 5б). Сульфат железа не оказывал влияния на активность фермента в корнях проростков. После повреждающего прогрева активность КАТ во всех вариантах опыта снижалась до приблизительно одинаковых величин, но в варианте с геминном абсолютные ее значения были несколько выше, чем в контроле (рис. 5б).

Активность ПО в присутствии ДМТМ не изменялась, однако скавенджер H_2O_2 в значительной степени нивелировал ее повышение, вызываемое обработкой проростков геминном (рис. 5в). Под действием $FeSO_4$ активность фермента не изменялась.

После повреждающего прогрева активность ПО в корнях проростков контрольного варианта несколько повышалась, а в варианте с обработкой геминном не изменялась (рис. 5в). При этом абсолютные величины в варианте с донором СО достоверно превышали значения контроля. Во всех остальных вариантах опыта отличия активности ПО от соответствующих значений контроля были несущественными.

В течение первых суток после повреждающего прогрева проростки оставались живыми, их повреждения не визуализировались. Однако выход соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, из клеток корней через сутки

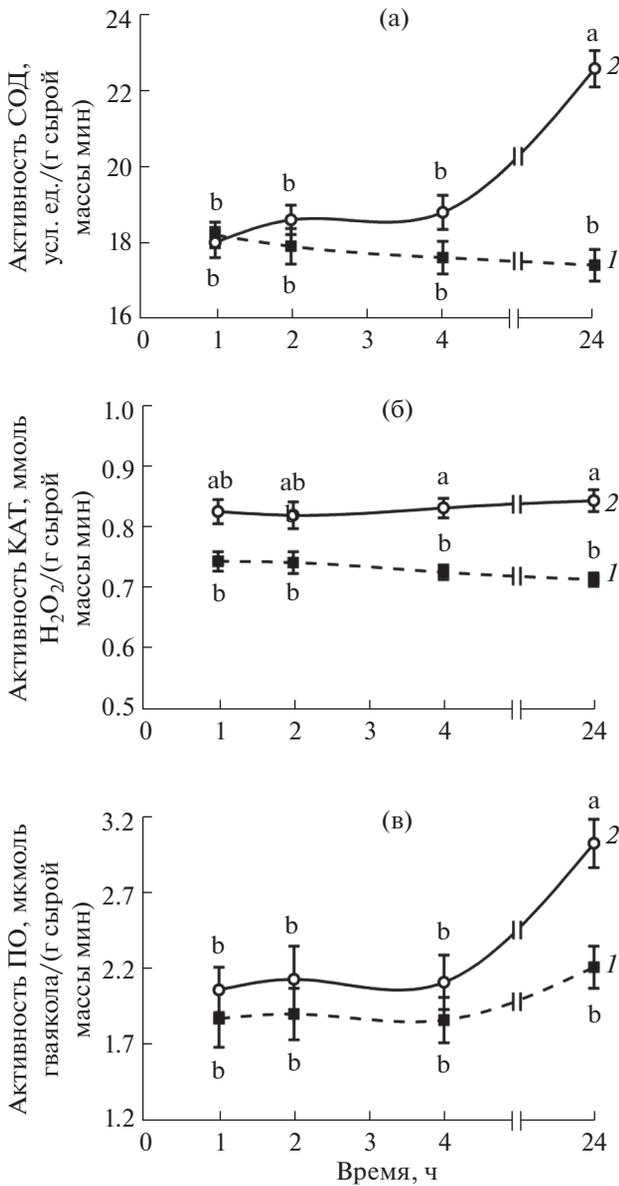


Рис. 4. Динамика активности СОД (а), КАТ (б) и растворимой ПО (в) в корнях проростков пшеницы при обработке геминном. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

после прогрева в контрольном варианте увеличился почти в два раза по сравнению с соответствующим показателем у проростков, которые не подвергались прогреву (рис. 6а). Обработка геминном значительно снижала выход веществ из корней проростков после повреждающего прогрева. Под влиянием ДМТМ, обладающего антиоксидантными свойствами, выход соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области, немного уменьшался, однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$. В то же время воздействие

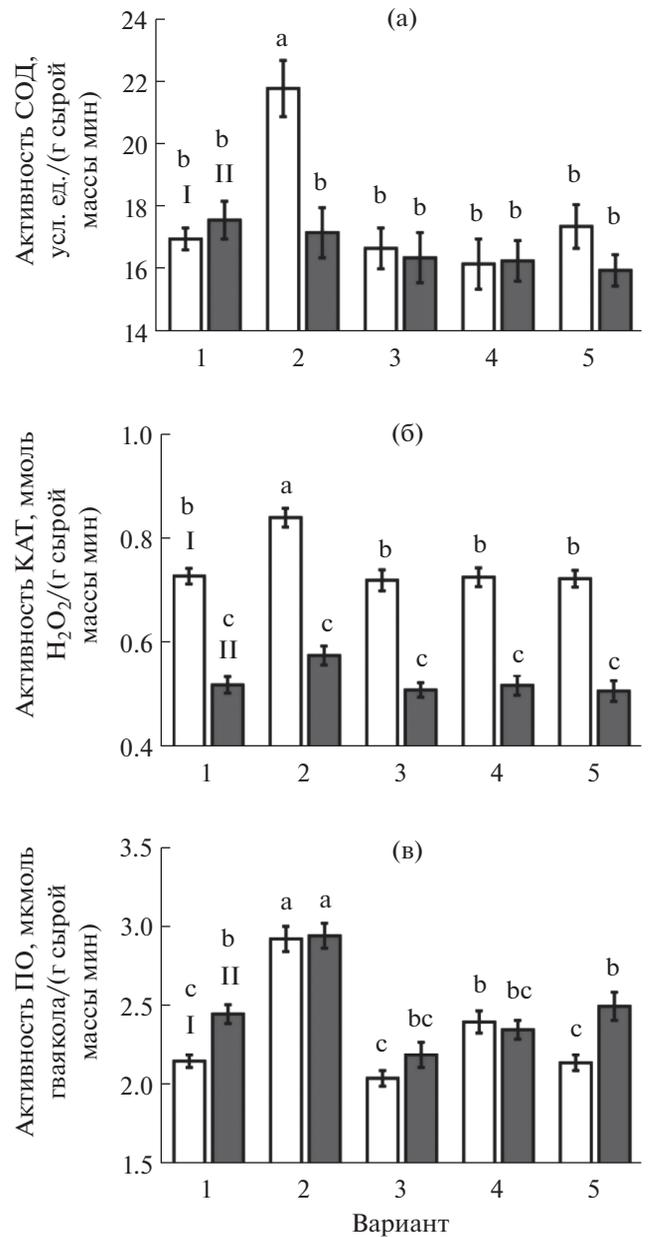


Рис. 5. Влияние гемина, ДМТМ и FeSO_4 на активность СОД (а), КАТ (б) и растворимой ПО (в) в корнях проростков пшеницы. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ДМТМ (150 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 5 – FeSO_4 (5 мкМ). I – перед повреждающим прогревом; II – через 24 ч после 10 мин прогрева при 45°C . Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Перед прогревом корни проростков инкубировали в течение 24 ч на растворах гемина или FeSO_4 , инкубация на растворе ДМТМ – 26 ч, при комбинированной обработке ДМТМ и геминном ДМТМ вносили в среду инкубации за 2 ч до введения в нее гемина.

ДМТМ практически полностью устраняло положительное влияние гемина на стабильность мембран клеток корней. Обработка сульфатом железа не оказывала влияния на вызываемый повреждаю-

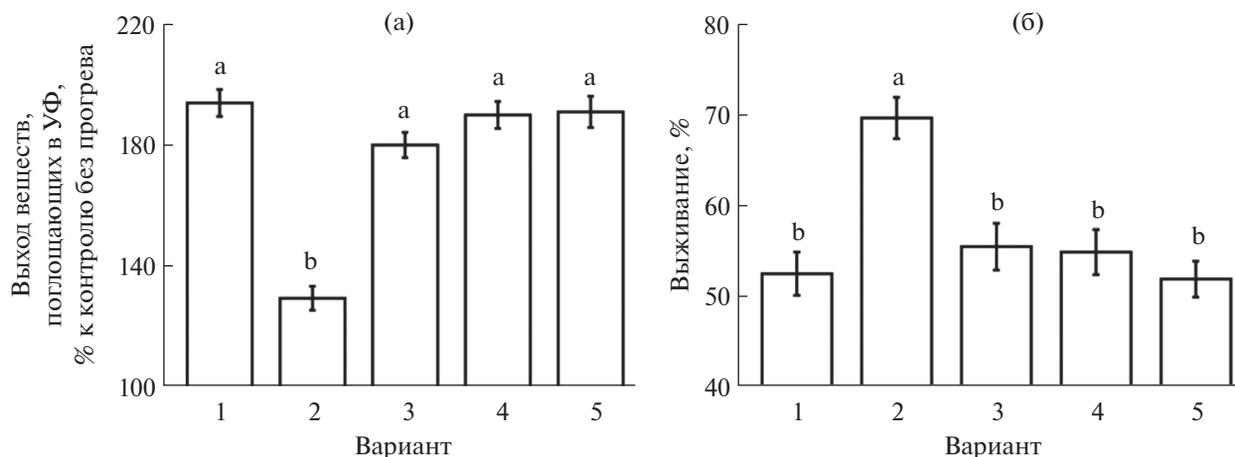


Рис. 6. Выход веществ, поглощающих в ультрафиолетовой (УФ) области спектра, из корней проростков пшеницы (а) и выживание проростков (б) после повреждающего прогрева. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ДМТМ (150 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 5 – FeSO_4 (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Выход веществ, поглощающих в УФ, определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 сут после повреждающего прогрева.

щим прогревом выход из клеток корней соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (рис. 6а).

Интегральный показатель выживания проростков через 3 сут после стрессового воздействия вполне соответствовал показателю выхода веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, который определяли раньше – через 1 сут после прогрева (рис. 6б). Так, под влиянием гемина выживание проростков значительно увеличилось, при обработке ДМТМ почти не изменилось, а при комбинированном действии их сквенджера пероксида водорода и гемина защитное действие последнего не проявлялось. Обработка проростков FeSO_4 не оказывала влияния на их выживание после повреждающего прогрева.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о положительном влиянии обработки проростков пшеницы донором СО гемом на их теплоустойчивость. Этот эффект проявлялся как в сохранении целостности мембран, определяемой по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра [24], так и в повышении интегрального показателя – выживания проростков через 3 сут после повреждающего прогрева (рис. 1, 6). Есть основания утверждать, что стресс-протекторные эффекты гемина в условиях наших экспериментов связаны с его действием именно как донора СО. Так, его защитное влияние на проростки при гипертермии полностью устранялось сквенджером монооксида углерода гемоглобином (рис. 1б). Кроме того, другой редокс-активный продукт реакции разложения гемина – Fe^{2+} ,

как показали специальные опыты с использованием FeSO_4 в концентрации 5 мкМ (эквивалентной концентрации гемина), не оказывал влияния на состояние мембран клеток корней после прогрева проростков и на их выживание после трехсуточного отращивания (рис. 6). Также обработка 5 мкМ FeSO_4 не влияла и на другие исследуемые показатели: содержание пероксида водорода (рис. 3) и активность антиоксидантных ферментов в корнях (рис. 5). Следует отметить, что соли Fe^{2+} используются в экспериментах в качестве агентов окислительного стресса. Однако, как показано нами ранее, FeSO_4 при обработке проростков пшеницы вызывал заметное проявление эффекта окислительного стресса в концентрации 5 мМ [25], то есть на три порядка превышающей используемую в настоящей работе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что физиологические эффекты донора СО гемина, по-видимому, реализуются с участием пероксида водорода как сигнального посредника. Так, под влиянием гемина происходило транзитное повышение содержания H_2O_2 в корнях проростков (рис. 2а). Похожую динамику имела и активность внеклеточной ПО (рис. 2б), которую рассматривают в качестве одного из важных продуцентов пероксида водорода [26]. При этом максимальное увеличение активности фермента немного опережало временной максимум содержания H_2O_2 (рис. 2), что указывает на причинно-следственную связь между активацией под влиянием обработки донором СО внеклеточной ПО и повышением содержания пероксида водорода в корнях.

Результаты ингибиторного анализа также свидетельствуют в пользу предположения об участии

внутриклеточной ПО в образовании АФК в корнях под влиянием доноров СО. Так, ингибитор ПО азид натрия как вызывал угнетение активности внутриклеточной формы этого фермента (рис. 3б), так и устранял повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков, обработанных донором СО (рис. 3а). Необходимо отметить, что NaN_3 , помимо ингибирования ПО, может подавлять цитохромное дыхание через цитохромксидазный комплекс. Хотя обычно для достижения такого эффекта на растительные клетки действуют этим метаболическим ядом в концентрациях, существенно превышающих использованную в наших опытах [27]. Тем не менее, побочных эффектов азидата натрия, в том числе связанных с подавлением цитохромного дыхания, полностью исключить нельзя, хотя есть основания полагать, что их проявление в кратковременных экспериментах относительно незначительное. При этом данные по временной динамике активности внутриклеточной ПО и содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при их обработке донором СО (рис. 2) и устранению азидом натрия как активации ПО, так и накопления H_2O_2 (рис. 3), позволяют предполагать важную роль именно этого фермента в образовании АФК, индуцируемом обработкой гематином.

По крайней мере, один из механизмов образования пероксида водорода с участием внутриклеточной ПО может заключаться в окислении $\text{НАД(Ф)} \cdot \text{H}$ молекулярным кислородом в присутствии фенольных кофакторов, происходящий по суммарному уравнению: $2\text{НАД(Ф)} \cdot \text{H} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{НАД(Ф)} + \text{H}_2\text{O}_2$ [26]. Полученные данные о возможной роли внутриклеточной ПО в генерации АФК клетками корней при действии донора СО согласуются с другим эффектом, изученным в работе Хуан и соавт. [17]. В ней показано устранение вызываемого гематином усиления роста корней проростков пшеницы при их обработке не только скавенджером пероксида водорода иодидом калия, но и ингибитором ПО салицилгидроксамовой кислотой. При этом, однако, вопрос о механизмах индуцирования монооксидом углерода образования АФК, зависящего от внутриклеточной ПО, остается открытым.

По-видимому, усиление образования H_2O_2 в корнях проростков при обработке донором СО является процессом, важным для активации антиоксидантной системы. Так, вызываемое донором СО повышение активности СОД, КАТ и ПО в корнях практически не проявлялось при их обработке скавенджером пероксида водорода ДМТМ (рис. 5). Эффекты повышения под влиянием экзогенного монооксида углерода активности антиоксидантных ферментов у растений разных таксономических групп, особенно в стрессовых условиях, к настоящему времени обнаружены во многих исследова-

ниях. Так, под влиянием водного раствора СО в корнях проростков пшеницы, подвергнутых действию NaCl , происходило усиление экспрессии гена Mn-SOD и повышение общей активности СОД [28]. У растений *Cassia obtusifolia*, подвергнутых действию стрессовых концентраций хлорида натрия, при обработке гематином отмечено увеличение активности СОД, КАТ, неспецифической ПО, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы [10]. Следует, однако, отметить, что в контексте устойчивости растений к гипертермии влияние доноров монооксида углерода на состояние ферментативной антиоксидантной системы до сих пор специально не исследовалось.

Таким образом, в нашей работе впервые показана роль пероксида водорода, вероятно, генерируемого с участием внутриклеточной ПО, в активации ферментативной антиоксидантной системы и развитии теплоустойчивости проростков пшеницы под действием донора СО.

Вполне очевидно, что обнаруженная в наших экспериментах АФК-опосредованная активация антиоксидантной системы при действии донора СО не единственный механизм, способствующий повышению теплоустойчивости проростков пшеницы. К настоящему времени также получены данные об усилении донорами СО накопления в растениях ряда мультифункциональных низкомолекулярных протекторных соединений. Так, у растений пшеницы при солевом стрессе обнаружено усиление донором СО экспрессии гена Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтазы и снижение экспрессии гена пролиндегидрогеназы, приводящее к накоплению пролина [29]. При осмотическом стрессе, обусловленном действием ПЭГ-6000, у проростков пшеницы, обработанных гематином, усиливалось накопление сахаров [5]. С участием монооксида углерода может активироваться и синтез алкалоидов. Недавно показано, что действие гипертермии на растения табака вызывало зависимый от гемоксигеназы-1 биосинтез СО в корнях, что индуцировало усиление образования жасмоновой кислоты. В результате этого активировался жасмонатный сигнальный каскад, что, в свою очередь, приводило к термоиндуцированному усилению синтеза никотина [7].

Обсуждая полученные в нашей работе результаты, нельзя исключить, что физиологические эффекты экзогенного СО отчасти могут быть связаны с изменением функционирования митохондрий как одного источников АФК [14]. Однако, насколько нам известно, специальных исследований регуляторного действия СО на образование АФК в митохондриях до сих пор не проводилось, хотя, по аналогии с клетками животных, предполагается возможность усиления генерации АФК за счет ингибирования монооксидом углерода комплекса IV (цитохромксидазы) [30]. Для

выяснения влияния СО на дыхательный метаболизм и возможного вклада этого метаболизма в формирование устойчивости растений необходимы специальные исследования.

Как сигнальная молекула СО, по-видимому, находится в сложном функциональном взаимодействии не только с АФК, но и многими другими посредниками и фитогормонами [2]. Получены доказательства участия ионов кальция [2], оксида азота [5] и сероводорода [8] в реализации стресс-протекторных эффектов доноров монооксида углерода. Известно, что основные газотрансмиттеры – NO, H₂S и СО – функционально связаны друг с другом, а также с АФК [2]. Однако исследования по выяснению этих связей при формировании индуцированной СО устойчивости растений к гипертермии и другим абиотическим стрессорам пока находятся на начальной, в основном феноменологической, стадии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. He H., He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses // *Nitric Oxide*. 2014. V. 42. P. 40.
2. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasnyy S.P., Dmitriev A.P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 392.
3. Yao Y., Yang Y., Li C., Huang D., Zhang J., Wang C., Li W., Wang N., Deng Y., Liao W. Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8: e605. <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
4. Shekhawat G.S., Verma K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 2255.
5. Liu Y., Xu S., Ling T., Xu L., Shen W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1371.
6. Verma K., Dixit S., Shekhawat G.S., Alam A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress // *Turk. J. Biol.* 2015. V. 39. P. 540.
7. Cheng T., Hu L., Wang P., Yang X., Peng Y., Lu Y., Chen J., Shi J. Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in Tobacco // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19: e188. <https://doi.org/10.3390/ijms19010188>
8. Li Z.-G., Gu S.-P. Hydrogen sulfide as a signal molecule in heme-induced heat tolerance of tobacco cell suspension // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 595.
9. Chen Q., Gong C., Ju X., Zhu Z., Shen W., Shen Z., Cui J. Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza sativa* L. // *J. Plant Growth Regul.* 2018. V. 37. P. 947.
10. Zhang C., Li Y., Yuan F., Hu S., He P. Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings // *Plant Soil.* 2012. V. 359. P. 85.
11. Ali S., Rizwan M., Arif M.S., Ahmad R., Hasanuzzaman M., Ali B., Hussain A. Approaches in enhancing thermotolerance in plants: an updated review // *J. Plant Growth Regul.* 2020. V. 39. P. 456.
12. Lobell D.B., Tebaldi C. Getting caught with our plants down: the risks of a global crop yield slowdown from climate trends in the next two decades // *Environ. Res. Lett.* 2014. V. 9: e074003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/7/074003>
13. Bhuyan M.H.M.B., Hasanuzzaman M., Parvin K., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Nahar K., Fujita M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress // *Plant Growth Regul.* 2020. V. 90. P. 409.
14. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 163.
15. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы // *Физиология растений*. 2013. Т. 60. С. 221.
16. She X.-P., Song X.-G. Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells // *J. Integr. Plant Biol.* 2008. V. 50. P. 1539.
17. Xuan W., Huang L., Li M., Huang B., Xu S., Liu H., Gao Y., Shen W. Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: a regulatory role of carbon monoxide in plants? // *Plant Growth Regul.* 2007. V. 52. P. 41.
18. Sa Z.S., Huang L.Q., Wu G.L., Ding J.P., Chen X.Y., Yu T., Ci S., Shen W.B. Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 49. P. 638.
19. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // *Protoplasma*. 2001. V. 217. P. 125.
20. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // *Physiol. Plant.* 2006. V. 127. P. 293.
21. Sung M., Hsu Y., Hsu Y. Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress // *Mar. Biotechnol.* 2009. V. 11. P. 199.
22. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Влияние модификации NO-статуса, закалывающего прогрева и пероксида водорода на

- активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 317.
23. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. 1976. V. 57. P. 308.
24. *Мелехов Е.И., Ефремова Л.К.* Влияние экзогенных фитогормонов на устойчивость растительных клеток к нагреву и 2,4-Д // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 561.
25. *Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Рябчун Н.И., Кириченко В.В.* Конститутивная и индуцированная холодом устойчивость проростков ржи и пшеницы к агентам окислительного стресса // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 346.
26. *Шарова Е.И., Медведев С.С.* Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 3.
27. *Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Иванов И.М., Суханова Е.С., Носов А.М.* Особенности дыхания и образования стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* при выращивании в колбах и биореакторах // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 594.
28. *Ling T., Zhang B., Cui W., Wu M., Lin J., Zhou W., Huang J., Shen W.* Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction // Plant Sci. 2009. V. 177. P. 331.
29. *Yuan X.X., Wang J., Xie Y.J., Shen W.B.* Effects of carbon monoxide on salt tolerance and proline content of roots in wheat seedling // Plant Physiol. Commun. 2009. V. 45. P. 567.
30. *Gupta K.J., Igamberdiev A.U.* Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview // Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Signaling and Communication in Plants. K.J. Gupta, A.U. Igamberdiev (eds.). Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 1.