

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГЕМИНА – ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

М.А. ШКЛЯРЕВСКИЙ¹, Ю.В. КАРПЕЦ¹, Ю.Е. КОЛУПАЕВ^{1,2,1}, А.А. ЛУГОВАЯ¹, А.П. ДМИТРИЕВ^{3,2}

¹ Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, 62483, Харьков, Украина

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, площадь Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина

³ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 148, 03143, Киев, Украина

E-mail: plant_biology@ukr.net¹, dmitriev.ap@gmail.com²

Монооксид углерода (СО) рассматривается как важная молекула-газотрансмиттер, задействованная в регуляции функциональной активности растений, в том числе в процессах адаптации к стрессовым факторам. Однако связи СО с другими участниками сигналинга в растительных клетках остаются малоисследованными. Ингибиторным методом изучали роль различных пулов кальция в реализации влияния донора монооксида углерода гемина на генерацию и обезвреживание активных форм кислорода (АФК) в клетках корней проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их устойчивость к повреждающему прогреву (45 °С, 10 мин). Обработка проростков 5 мкМ геминном вызывала транзитное повышение активности внеклеточной пероксидазы в корнях и усиление генерации АФК с максимумом через 1,5–2 ч после начала воздействия. Хелатор внеклеточного кальция ЭГТА и ингибитор образований инозитол-1,4,5-фосфата неомицин, снижающий поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов, практически полностью устраняли повышение активности внеклеточной пероксидазы, вызываемое экзогенным СО. При этом ЭГТА (полностью) и неомицин (частично) нивелировали повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков, происходящее под влиянием донора СО. Обработка проростков геминном также индуцировала повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы и внутриклеточной пероксидазы в корнях. Оба кальциевых антагониста устраняли эти эффекты. Также в присутствии ЭГТА и неомицина не проявлялось положительное влияние обработки геминном на состояние биомембран и выживание проростков после повреждающего прогрева. Сделано заключение, что как внеклеточный, так и депонированный во внутриклеточных компартментах кальций участвует в вызываемом донором СО усилении образования АФК, индуцировании антиоксидантной системы и развитии теплоустойчивости проростков пшеницы.

© М.А. ШКЛЯРЕВСКИЙ, Ю.В. КАРПЕЦ,
Ю.Е. КОЛУПАЕВ, А.А. ЛУГОВАЯ, А.П. ДМИТРИЕВ,
2020

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., монооксид углерода, кальций, активные формы кислорода, теплоустойчивость

Введение. В настоящее время монооксид углерода (СО) признан в качестве одной из важных сигнальных молекул не только в организме животных, но и растений [1]. Этот газотрансмиттер, взаимодействуя с другими посредниками и фитогормонами, принимает участие в регуляции роста и развития растений [2–4], в частности, активизирует прорастание семян [5], развитие корневой системы [6, 7], регулирует устьичные движения [1], замедляет старение листьев и плодов [8, 9].

Особенно важную роль монооксид углерода может играть в процессах адаптации растений к действию стрессоров [1, 10]. Обнаружено усиление экспрессии гена гемоксигеназы 1 – основной молекулярной формы фермента, образующей СО в результате окислительной дегградации гема [11], при действии на растительные объекты обезвоживания [12], солевого стресса [13], УФ-В [2], тяжелых металлов [1] и других неблагоприятных факторов [14]. Повышение содержания СО в клетках растений различных видов зарегистрировано при водном [12] и солевом [15] стрессах, гипо- [16] и гипертермии [17]. Также получены данные о повышении устойчивости растений к стресс-факторам различной природы под влиянием экзогенного газообразного СО либо его доноров [18–20]. В качестве последних обычно используют искусственные субстраты гемоксигеназы, в частности, гематин [21] и гемин [17].

Сигнальные молекулы, как правило, реализуют свои физиологические эффекты не обособленно, а как участники сети сигналинга. Связь СО с другими компонентами сигнальной

сети остается малоисследованной. Одним из посредников, задействованных в реализации физиологических эффектов СО как сигнальной молекулы, могут быть активные формы кислорода (АФК). Вызываемый гематином или газобразным СО эффект закрывания устьиц у бобов подавлялся антиоксидантом аскорбатом и ингибитором НАДФН-оксидазы дифениленионидиумом [22]. НАДФН-оксидаза является одним из основных ферментов, генерирующих АФК на внешней поверхности клеток [23]. В отдельных эффектах монооксида углерода, по видимому, принимает участие и пероксидаза, которая рассматривается не только как один из антиоксидантных ферментов, но и в качестве каталитической системы, генерирующей АФК [24]. Эта функция особенно свойственна внеклеточным формам пероксидазы [25]. Показано, что стимулированное гематином или геминем удлинение корней проростков пшеницы сопровождалось образованием пероксида водорода и устранялось ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой [26].

Универсальным сигнальным посредником является кальций. Его роль в проявлении сигнальных эффектов СО у растений изучена пока очень слабо. Для животных клеток имеются данные о возможности влияния СО на белки ионных каналов, в том числе кальциевых каналов L-типа [27]. Однако предполагается, что эти эффекты могут быть опосредованы действием АФК, образующихся в клетках под влиянием СО. В некоторых работах, выполненных на растительных объектах, показано устранение физиологического действия монооксида углерода и его доноров в присутствии кальциевых антагонистов. Так, ростовое влияние гематина на проростки пшеницы устранялось антагонистами кальция ЭГТА и рутениевым красным [28]. Также показано, что при индуцировании образования латеральных корней у риса обработкой метилжасмонатом [29] либо хлоридом кобальта [30], ионы Ca^{2+} действуют ниже гемосигналы и СО.

Между АФК и ионами кальция как сигнальными посредниками существует тесная функциональная связь. Ионы кальция необходимы для активации НАДФН-оксидазы [31] и стабилизации структуры пероксидазы [32], которая, как отмечалось выше, может катализировать генерацию АФК. С другой стороны, со-

стояние кальциевых каналов различных типов зависит от образования АФК во внеклеточном пространстве [33]. Ранее нами показан эффект индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы геминем и его устранение скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевинной [34]. При этом вопрос о роли кальция в реализации влияния донора СО на редокс-гомеостаз клеток проростков пшеницы и их теплоустойчивость оставался открытым.

Целью настоящей работы было изучение участия различных пулов кальция в регуляции донором СО геминем образования и обезвреживания АФК в корнях проростков пшеницы и индуцировании их теплоустойчивости.

Материалы и методы. Зерновки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала обеззараживали 6% пероксидом водорода в течение 30 мин и проращивали в течение 4 суток при температуре около 20 °С 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 концентрации 5 мкМ и выдерживали проростки в течение 24 ч. Оптимальная концентрация гемина, при которой отмечалось максимальное повышение теплоустойчивости проростков, была установлена ранее [34]. Также ранее с использованием скавенджера СО гемоглобина была показана специфичность стресс-протекторного действия гемина как донора монооксида углерода: в присутствии гемоглобина защитный эффект обработки проростков геминем не проявлялся [34].

При изучении влияния хелатора кальция ЭГТА (500 мкМ) и ингибитора образования инозитол-1,4,5-фосфата неомицина (200 мкМ) на теплоустойчивость проростков и биохимические показатели инкубации корней в растворах составляла 26 ч. При оценке совместного действия гемина и антагонистов кальция последние добавляли в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее гемина. Концентрации исследуемых соединений выбирали на основании предварительных опытов.

Все биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны к воздействиям экзогенных сое-

динений и теплового стресса [35]. Во время инкубации проростков на исследуемых растворах определяли активность внеклеточной пероксидазы, генерацию корнями супероксидного анион-радикала, содержание в них пероксида водорода и активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и растворимой внутриклеточной пероксидазы.

После окончания инкубации на растворах гемина и исследуемых ингибиторов проростки подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре 45 °С в течение 10 мин [35]. В дальнейшем их переносили на очищенную водопроводную воду и выдерживали в течение трех суток при температуре около 20 °С и освещении 6000 лк для оценки выживания.

Активность внеклеточной пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли в корнях проростков, как описано в [36] с модификациями. Корни исследуемых интактных проростков помещали в стаканчики с дистиллированной водой, рН которой 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.

Генерацию супероксидного анион-радикала корнями интактных проростков определяли по превращению нитросинего тетразолия в формазан, как описано ранее [35].

Для анализа содержания пероксида водорода корни на холоде гомогенизировали в 5%-ной трихлоруксусной кислоте. Пробы центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при температуре 2–4 °С на центрифуге MPW 350R («MPW MedInstruments», Польша) и в супернатанте определяли концентрацию H_2O_2 с помощью ферроцианиднатного метода [37].

Для определения 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) [38]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С. 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 НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при рН 7,0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность растворимой внутриклеточной пероксидазы определяли при рН 6,2, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата — пероксид водорода. Активность СОД выражали в усл. ед./г сырой массы · мин), каталазы — в ммоль H_2O_2 /г сырой массы · мин), пероксидазы — в усл. ед./г сырой массы · мин).

Состояние мембран клеток корней оценивали через 24 ч после повреждающего прогрева по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой (УФ-В) области спектра (преимущественно свободных нуклеотидов) [39]. Корни интактных проростков погружали в стаканчики с дистиллированной водой на 1 ч, после чего отделяли от проростков и взвешивали. Оптическую плотность инкубационного раствора определяли при A_{252} и A_{264} . Выход веществ оценивали 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-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводили 3 раза. На рисунках и в таблице приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются эффекты, достоверные при $P \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Обработка донором СО гемом вызывала существенное транзитное повышение активности внеклеточной пероксидазы в корнях проростков, максимум которого наблюдался через 1,5 ч (рис. 1). Через 1,5–2 ч после действия гемина также отмечалось повышение содержания пероксида водорода в корнях. В этот же период наблюдали тенденцию к усилению генерации супероксидного анионрадикала, однако такой эффект был незначительным и достоверным только при $P \leq 0,1$ (рис. 1).

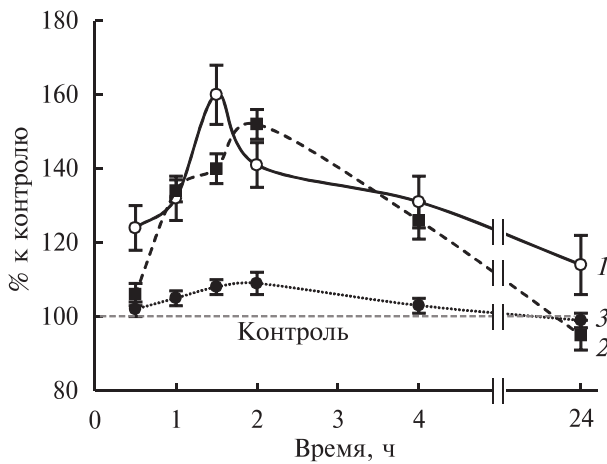


Рис. 1. Динамика активности внеклеточной гваяколпероксидазы (1), содержания пероксида водорода (2) и генерации супероксидного анион-радикала (3) в корнях проростков пшеницы при обработке 5 мкМ гемином (% к контролю)

Ранее в идентичных экспериментальных условиях нами было показано устранение ингибитором пероксидазы азидом натрия как вызываемого обработкой гемином повышения активности внеклеточной пероксидазы, так и увеличения содержания пероксида водорода в корнях [34]. Этот факт, а также более раннее повышение активности внеклеточной пероксидазы по сравнению с эффектом увеличения содержания пероксида водорода (рис. 1), позволяют полагать, что внеклеточная пероксидаза является одним из основных ферментов, участвующих в усилении генерации пероксида водорода в тканях корней при их обработке донором СО гемином.

В дальнейших экспериментах ингибиторным методом исследовали возможную роль поступления кальция из внеклеточного пространства и внутриклеточных компартментов в цитозоль в регуляции активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода в корнях при действии на них гемина. Обработка проростков хелатором внеклеточного кальция ЭГТА вызывала тенденцию к небольшому снижению активности внеклеточной пероксидазы в корнях (рис. 2, а). Однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0,05$. При этом ЭГТА полностью устранял вызываемое донором СО повышение активности внеклеточной пероксидазы. Под влиянием

неомицина также наблюдалась тенденция к незначительному снижению активности фермента. Неомидин, как и ЭГТА, полностью нивелировал повышение активности внеклеточной пероксидазы при обработке проростков гемином (рис. 2, а).

Обработка ЭГТА немного снижала содержание пероксида водорода (рис. 2, б), эффект проявлялся на уровне тенденции ($P \leq 0,1$). При этом указанный ингибитор поступления кальция из внеклеточного пространства почти полностью снимал эффект увеличения содержания пероксида водорода, вызываемый обработкой донором СО. Другой антагонист кальция — неомицин — сам по себе не оказывал влияния на содержание пероксида водорода в корнях, однако заметно, хотя и не полностью, снижал проявление эффекта повышения содержания H_2O_2 под действием гемина (рис. 2, б).

Эти результаты дают основания полагать, что для вызываемого донором СО повышения активности внеклеточной пероксидазы и накопления пероксида водорода необходимо поступление кальция в цитозоль, как из внеклеточного пространства, так и из внутренних компартментов.

В связи со способностью донора СО индуцировать генерацию АФК клетками корней проростков пшеницы представлялось целесообразным исследовать его влияние на активность ключевых антиоксидантных ферментов в обычных условиях и после повреждающего прогрева проростков.

Обработка проростков гемином вызывала повышение активности СОД в корнях, достоверный эффект отмечался через 24 ч после начала воздействия донора СО (таблица). После прогрева в контрольном варианте активность фермента существенно не изменялась, а в варианте с обработкой гемином снижалась и была на уровне соответствующих значений контроля.

Тенденция к повышению активности каталазы под влиянием донора СО отмечалась уже через 4 ч после начала обработки, а к 24 ч увеличение активности фермента было более существенным (таблица). Повреждающий прогрев вызывал снижение активности каталазы как в контроле, так и при обработке донором монооксида углерода. Однако в варианте с СО

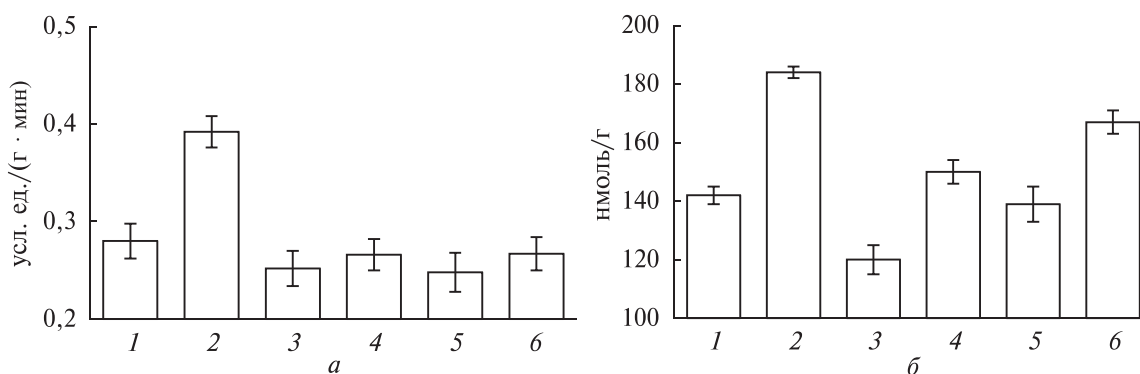


Рис. 2. Влияние гемина и антагонистов кальция на активность внеклеточной пероксидазы, усл. ед./г сырого вещества · мин) (а) и содержание пероксида водорода, нмоль/г сырого вещества (б) в корнях проростков пшеницы. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – гемин (5 мкМ) + неомицин (200 мкМ). Примечание. Активность внеклеточной пероксидазы определяли через 1,5 ч после начала инкубации корней в растворе гемина или через 3,5 ч от начала действия кальциевых антагонистов; содержание пероксида водорода анализировали через 2 ч после начала инкубации корней в растворе гемина или через 4 ч от начала действия кальциевых антагонистов

абсолютная величина активности фермента была выше, чем в соответствующем контроле.

Активность внутриклеточной растворимой пероксидазы под влиянием обработки корней геминном достоверно повышалась через 24 ч (таблица). Повреждающий прогрев вызывал небольшое увеличение активности растворимой пероксидазы в контроле. В варианте с донором СО активность фермента изменялась незначительно. При этом после прогрева абсолютные величины активности пероксидазы

в случае обработки проростков геминном были достоверно выше, чем в соответствующем контроле.

Поскольку под влиянием донора СО наиболее заметные изменения активности антиоксидантных ферментов проявлялись через 24 ч после обработки геминном, именно в этой временной точке исследовали возможное значение кальция для реализации влияния экзогенного СО на активность СОД, каталазы и пероксидазы.

Активность антиоксидантных ферментов в корнях проростков пшеницы при обработке геминном и действии теплового стресса

Вариант	Фаза эксперимента		
	Через 4 ч после начала обработки геминном	Через 24 ч после начала обработки геминном	Через 24 ч после повреждающего прогрева
СОД, усл. ед./г сырого вещества · мин)			
Контроль	18,6 ± 0,32	18,9 ± 0,33	19,2 ± 0,52
Гемин (5 мкМ)	20,3 ± 0,41	24,4 ± 0,46	19,6 ± 0,60
Каталаза, ммоль Н ₂ О ₂ /г сырого вещества · мин)			
Контроль	0,682 ± 0,014	0,667 ± 0,016	0,492 ± 0,010
Гемин (5 мкМ)	0,779 ± 0,017	0,814 ± 0,024	0,566 ± 0,014
Пероксидаза, усл. ед./г сырого вещества · мин)			
Контроль	2,01 ± 0,05	2,06 ± 0,08	2,34 ± 0,06
Гемин (5 мкМ)	2,23 ± 0,06	2,72 ± 0,04	2,83 ± 0,06

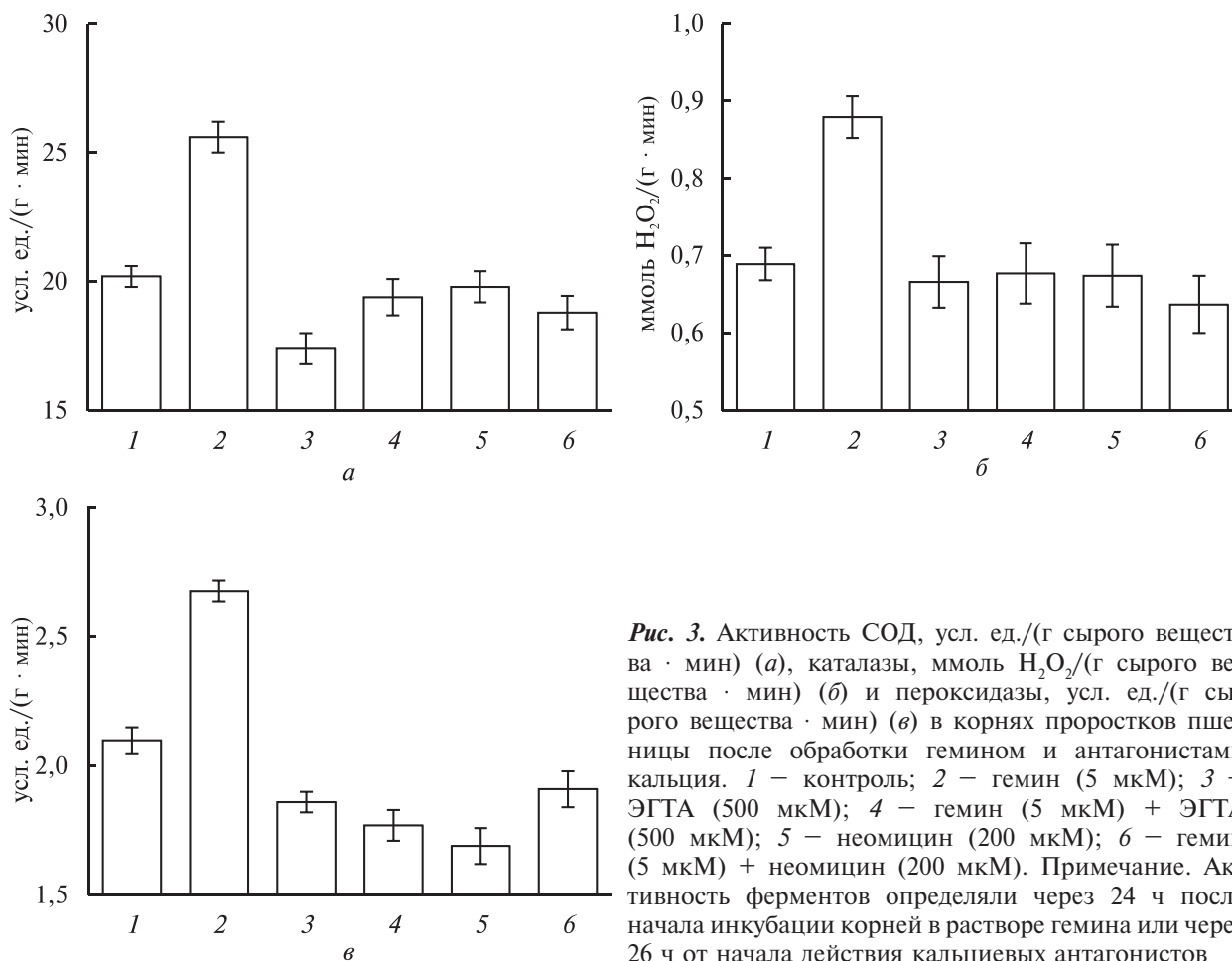


Рис. 3. Активность СОД, усл. ед./г сырого вещества · мин) (а), каталазы, ммоль H₂O₂/г сырого вещества · мин) (б) и пероксидазы, усл. ед./г сырого вещества · мин) (в) в корнях проростков пшеницы после обработки геминном и антагонистами кальция. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – гемин (5 мкМ) + неомицин (200 мкМ). Примечание. Активность ферментов определяли через 24 ч после начала инкубации корней в растворе гемина или через 26 ч от начала действия кальциевых антагонистов

Обработка проростков ЭГТА вызывала некоторое снижение активности СОД и устраняла эффект ее повышения, наблюдаемый под действием донора СО (рис. 3, а). При инкубации корней в присутствии неомицина активность СОД не изменялась, в то же время этот антагонист кальция полностью нивелировал увеличение активности фермента, которое происходило при обработке геминном.

Активность каталазы в вариантах с обработкой проростков обоими исследуемыми антагонистами кальция (ЭГТА и неомицином) не изменялась (рис. 3, б). Однако, как хелатор внеклеточного кальция, так и ингибитор синтеза инозитол-1,4,5-фосфата полностью устраняли вызываемое донором СО повышение активности фермента в корнях.

В присутствии в среде ЭГТА отмечалась тенденция к снижению активности раствори-

мой пероксидазы (рис. 3, в). При этом в варианте с сочетанием обработки корней геминном и ЭГТА не только не происходило повышения активности фермента, но и наблюдалось ее снижение по сравнению с контролем. Обработка неомицином сама по себе вызывала снижение активности внутриклеточной пероксидазы в корнях и полностью устраняла ее повышение, вызываемое действием донора СО (рис. 3, в).

Таким образом, как хелатор кальция ЭГТА, так и ингибитор поступления кальция из внутриклеточных компартментов неомицин устраняли вызываемый геминном эффект повышения в корнях проростков пшеницы активности всех трех изученных антиоксидантных ферментов.

Повреждающий прогрев проростков более чем на 80 % усиливал выход из корней веществ, поглощающих в области УФ-В (рис. 4, а). Обработка проростков геминном уменьшала этот

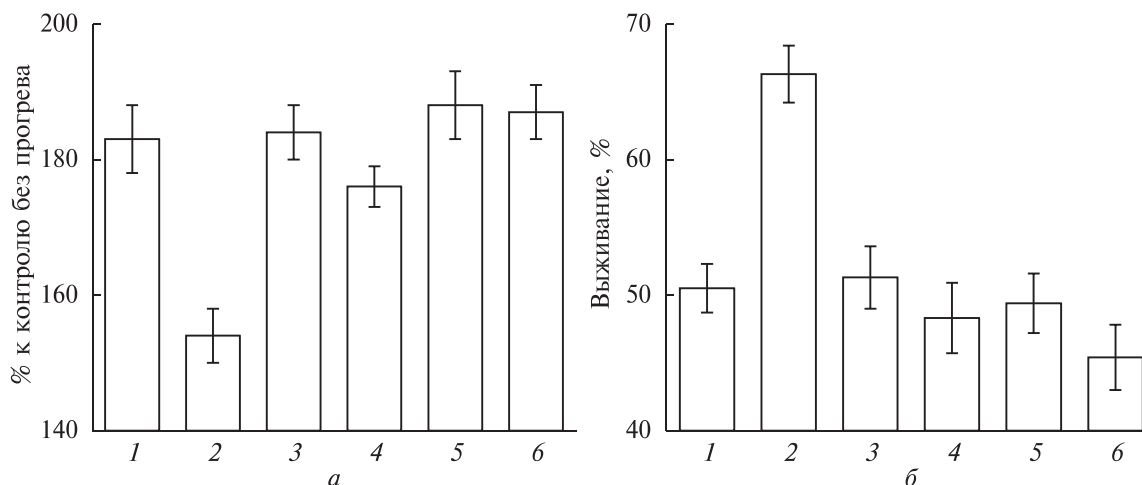


Рис. 4. Выход веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, из корней проростков пшеницы, % к контролю без прогрева (а) и выживание проростков, % (б) после повреждающего прогрева. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – гемин (5 мкМ) + неомицин (200 мкМ). Примечание. Выход веществ, поглощающих в УФ, определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 суток после повреждающего прогрева

эффект почти на 30 %, что свидетельствует о мембрано-протекторном влиянии обработки проростков донором СО. Антагонисты кальция сами по себе не оказывали существенного влияния на вызываемый стрессовым воздействием выход веществ, поглощающих в УФ-В. Однако обработка проростков как ЭГТА, так и неомицином устраняла мембрано-протекторное действие донора СО (рис. 4, а).

Выживание проростков, обработанных ЭГТА и неомицином, существенно не отличалось от такового в контроле (рис. 4, б). Однако хелатор внеклеточного кальция (ЭГТА) и ингибитор синтеза инозитол-1,4,5-фосфата (неомицин) в полной мере снимали положительное влияние донора монооксида углерода на теплоустойчивость проростков.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значении поступления кальция в цитозоль как из внеклеточного пространства, так и из внутриклеточных компартментов в реализации стресс-протекторного действия донора СО на проростки пшеницы, подвергнутые прогреву. Наряду с кальцием в трансдукции сигнала, вызываемого экзогенным СО, задействованы АФК. На это указывает транзитное усиление их генерации корнями проростков через 1,5–2 ч после начала обработки геми-

ном (рис. 1). Другим свидетельством участия АФК в развитии теплоустойчивости проростков под действием экзогенного СО может быть устранение его защитного эффекта антиоксидантом диметилтиомочевинной [34].

Одним из основных ферментативных источников АФК, активируемых обработкой донором СО, по-видимому, является внеклеточная пероксидаза, максимальное повышение активности которой предшествовало пику увеличения содержания пероксида водорода в корнях (рис. 1). Известно, что пероксидаза при наличии достаточного пула восстановителей обладает способностью непосредственно генерировать пероксид водорода, а не только супероксидный анион-радикал, превращающийся затем в H_2O_2 [24, 40]. Активацию именно такого механизма образования пероксида водорода можно считать вероятной при обработке корней проростков пшеницы геминном, поскольку она вызывала значительное повышение содержания пероксида водорода в корнях при очень слабом усилении генерации супероксидного анион-радикала (рис. 1). Кроме того, как было показано ранее, вызываемое обработкой геминном накопление пероксида водорода в тканях корней проростков устранялось ингибитором пер-

оксидазы (азидом натрия), но не ингибитором НАДФН-оксидазы (имидазолом) [34].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение активности внеклеточной пероксидазы, происходящее под влиянием донора СО, является кальций-зависимым процессом, поскольку устраняется как хелатором кальция ЭГТА, так и ингибитором выхода кальция в цитозоль из внутриклеточного пространства неомицином (рис. 2, а). Известно, что пероксидазы класса III содержат два катиона кальция на каждую молекулу фермента [32]. При этом кальций необходим для стабилизации структуры фермента и сохранения его каталитической активности в различных условиях. В ряде работ показано повышение активности пероксидазы, в том числе внеклеточных ее форм, у растений пшеницы под действием экзогенного кальция [41–43]. Также установлено, что в присутствии повышенных концентраций кальция в среде усиливалась экскреция пероксидазы из каллусной ткани табака [44]. В условиях наших экспериментов антагонисты кальция ЭГТА и неомицин полностью устраняли вызываемое обработкой донором СО повышение активности внеклеточной пероксидазы в корнях. При этом ЭГТА полностью нивелировал увеличение содержания пероксида водорода в корнях, происходящее в ответ на действие донора СО, а неомицин снимал этот эффект частично (рис. 2, б). Возможно, что различия влияния двух антагонистов кальция на индуцированные донором СО эффекты увеличения содержания пероксида водорода и активности внеклеточной пероксидазы указывают на то, что активация этого фермента не единственная причина увеличения содержания пероксида водорода в клетках корней. Как уже отмечалось, обработка корней ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом почти не уменьшала эффект повышения содержания H_2O_2 в корнях при обработке гемом [34]. Тем не менее, вклад НАДФН-оксидазы, по крайней мере, в качестве минорного участника процесса образования пероксида водорода, активируемого действием донора СО, полностью исключить нельзя. Кроме того, как известно, АФК могут генерироваться в апопласте и с участием

других ферментов — ди- и полиаминоксидаз, оксалатоксидазы [24]. Их возможная роль в реализации эффектов СО остается пока неизученной.

Судя по полученным результатам, кальций задействован как в формировании АФК-сигнала, появляющегося в клетках при обработке донором СО, так и в дальнейших сигнальных процессах, обусловленных действием АФК. Так, вызываемое обработкой гемом повышение активности антиоксидантных ферментов — СОД, каталазы, растворимой пероксидазы — не проявлялось при обработке проростков ЭГТА и неомицином (рис. 3). По-видимому, индуцированная монооксидом углерода активация антиоксидантной системы требует поступления кальция как извне, так и из внутриклеточных компартментов. В целом, эффекты кальций-зависимой активации антиоксидантной системы при действии факторов различной природы описаны в ряде источников [43, 45]. В настоящее время накоплено много экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что кальций в сигнальных цепях находится как выше, так и ниже АФК [46, 47].

Вполне естественно, что опосредованная кальцием и АФК активация антиоксидантной системы при действии донора СО не единственный механизм его стресс-протекторного действия. Известны сведения об усилении донорами монооксида углерода синтеза у растений ряда полифункциональных низкомолекулярных протекторных соединений. Так, у растений пшеницы при солевом стрессе показано усиление донором СО экспрессии гена Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат-синтазы, приводящее к накоплению пролина [21]. При осмотическом стрессе у проростков пшеницы, обработанных донором монооксида углерода гематином, увеличивалось содержание сахаров [48].

Так или иначе, в условиях наших экспериментов влияние донора СО на интегральные показатели (состояние мембран и выживание растений после стрессового воздействия) не проявлялось в присутствии ЭГТА и неомицина, что свидетельствует о роли различных пулов кальция в процессе индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенным монооксидом углерода.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование не получало какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

CALCIUM-DEPENDENT CHANGES OF CELLULAR REDOX-HOMEOSTASIS AND HEAT RESISTANCE OF WHEAT PLANTLETS UNDER INFLUENCE OF HEMIN – CARBON MONOOXIDE DONOR

M.A. Shkliarevskiy, Yu.V. Karpets, Yu.E. Kolupaev, A.A. Lugovaya, A.P. Dmitriev

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevske-2, 62483, Kharkiv, Ukraine
 Karazin Kharkiv National University, Svobody sq., 4, 61022, Kharkiv, Ukraine
 Institute of Cellular Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, Academic Zabolotniy St., 148, 03143, Kyiv, Ukraine

E-mail: plant_biology@ukr.net, dmitriev.ap@gmail.com

Carbon monoxide (CO) is considered as the important molecule-gasotransmitter involved in the regulation of functional activity of plants, including processes of adaptation to stress factors. However, the crosstalk of CO with other participants of signaling in plant cells remains low-studied. The role of various pools of calcium in the realization of hemin (carbon monooxide donor) influence on the generation and neutralization of reactive oxygen species (ROS) in cells of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plantlets and their resistance to the damaging heating (45 °C, 10 min) has been investigated by the inhibitory method. The treatment of plantlets with 5 μM hemin caused the transitional increase in activity of exocellular peroxidase in roots and the intensifying of ROS generation with the maximum in 1,5-2 h after the influence starts. The chelator of exocellular calcium EGTA and the inhibitor of formation of inositol-1,4,5-phosphate neomycin, which reduces the influx of calcium into the cytosol from intracellular compartments, almost completely eliminated the increase in activity of exocellular peroxidase, caused by exogenous CO. At the same time, EGTA (completely) and neomycin (partially) leveled the increase in content of hydrogen peroxide in roots of plantlets, occurred under the influence of CO donor. The treatment of plantlets with hemin induced also the increase in activity of superoxide dismutase, catalase

and intracellular re-oxidase in roots. Both calcium antagonists removed these effects. And also in the presence of EGTA and neomycin, the positive influence of treatment with hemin on the state of biomembranes and survival of plantlets after the damaging heating was not shown. The conclusion is made that calcium, both exocellular and deposited in intracellular compartments, participates in the intensifying of ROS formation, induction of antioxidative system and development of heat resistance of wheat plantlets, affected by CO donor.

КАЛЬЦІЙ-ЗАЛЕЖНІ ЗМІНИ КЛІТИННОГО РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗУ І ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ПІД ДІЄЮ ГЕМІНУ – ДОНОРА МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ

М.А. Шклярєвський, Ю.В. Карпєць, Ю.Є. Колупаєв, Г.А. Лугова, О.П. Дмитрієв

Монооксид вуглецю (СО) розглядається як важлива молекула-газотрансмітер, задіяна у регуляції функціональної активності рослин, у тому числі в процесах адаптації до стресових чинників. Однак зв'язки СО з іншими учасниками сигналіngu в рослинних клітинах залишаються малодослідженими. Інгібіторним методом вивчали роль різних пулів кальцію в реалізації впливу донора монооксиду вуглецю геміну на генерацію і знешкодження активних форм кисню (АФК) в клітинах коренів проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) та їх стійкість до ушкоджуючого прогріву (45 °C, 10 хв). Обробка проростків 5 мкМ геміном викликала транзиторне підвищення активності позаклітинної пероксидази в коренях і посилення генерації АФК з максимумом через 1,5–2 год від початку впливу. Хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітор утворення інозитол-1,4,5-фосфату неоміцину, що знижує надходження кальцію в цитозоль із внутрішньоклітинних компартментів, практично повністю усували підвищення активності позаклітинної пероксидази, спричинюване екзогенним СО. При цьому ЕГТА (повністю) і неоміцину (частково) нівелювали підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків, що відбувалося під впливом донора СО. Обробка проростків геміном також індукувала підвищення активності супероксиддисмутази, каталази і внутрішньоклітинної пероксидази у коренях. Обидва кальцієві антагоністи усували ці ефекти. Також у присутності ЕГТА і неоміцину не виявлявся позитивний вплив обробки геміном на стан біомембран і виживаність проростків після ушкоджуючого прогріву. Зроблено висновок, що як позаклітинний, так і депонований у внутрішньоклітинних компартментах кальцій бере участь у спричинюваному донором СО посиленні утворення

АФК, індуванні антиоксидантної системи і розвитку теплостійкості проростків пшениці.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. He, H., He, L., The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses. *Nitric Oxide*, 2014, vol. 42, pp. 40–3. doi: 10.1016/j.niox.2014.08.011.
2. Santa-Cruz, D.M., Pacienza, N.A., Polizio, A.H., Balestrasse, K.B., Tomaro, M.L., and Yannarelli, G.G., Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultra-violet-B-irradiated soybean plants. *Phytochem.*, 2010, vol. 71, no. 14–5, pp. 1700–07. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.07.009.
3. Lin, Y.T., Zhang, W., Qi, F., Cui, W.T., Xie, Y.J., and Shen, W.B., Hydrogen-rich water regulates cucumber adventitious root development in a heme oxygenase-1/carbon monoxide-dependent manner. *J. Plant Physiol.*, 2014, vol. 171, no. 2, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jplph.2013.08.009.
4. Xie Y.J., Zhang C., Lai D.W., Sun Y., Samma M.K., Zhang J., and Shen W., Hydrogen sulfide delays GA-triggered programmed cell death in wheat aleurone layers by the modulation of glutathione homeostasis and heme oxygenase-1 expression. *J. Plant Physiol.*, 2014, vol. 171, no. 2, 53–62. doi: 10.1016/j.jplph.2013.09.018.
5. Dekker, J., Hargrove, M., Weedy adaptation in *Setaria* spp. V. Effects of gaseous environment on giant foxtail (*Setaria faberii*) (*Poaceae*) seed germination. *Amer. J. Bot.* 2002, vol. 89, no. 3, pp. 410–6. doi: 10.3732/ajb.89.3.410.
6. Cui, W.T., Qi, F., Zhang, Y.H., Cao, H., Zhang, J., Wang, R., and Shen, W., Methane-rich water induces cucumber adventitious rooting through heme oxygenase1/carbon monoxide and Ca²⁺ pathways. *Plant Cell Rep.*, 2015, vol. 34, no. 3, pp. 435–45. doi: 10.1007/s00299-014-1723-3.
7. Chen, Y., Wang, M., Hu, L., Liao, W., Dawuda, M.M., and Li, C., Carbon monoxide is involved in hydrogen gas-induced adventitious root development in cucumber under simulated drought stress. *Front Plant Sci.*, 2017, vol. 8, 128. doi: 10.3389/fpls.2017.00128
8. Huang, J., Han, B., Xu, S., Zhou, M., and Shen, W., Heme oxygenase-1 is involved in the cytokinin-induced alleviation of senescence in detached wheat leaves during dark incubation. *J. Plant Physiol.*, 2011, vol. 168, no. 8, pp. 768–75. doi: 10.1016/j.jplph.2010.10.010.
9. Zhang, S., Li, Y., and Pei, F., Carbon monoxide fumigation improved the quality, nutrients, and antioxidant activities of postharvest peach. *Int. J. Food Sci.*, 2014, vol. 2014, 834150. doi: 10.1155/2014/834150.
10. Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V., Beschasniy, S.P., and Dmitriev, A.P., Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.*, 2019, vol. 53, no. 5, pp. 392–406. doi: 10.3103/S0095452719050098.
11. Shekhawat, G.S., Verma, K., Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *J. Exp. Bot.*, 2010, vol. 61, no. 9, pp. 2255–70. doi: 10.1093/jxb/erq074.
12. Liu, Y., Xu, S., Ling, T., Xu, L., and 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, vol. 167, no. 16, pp. 1371–9. doi: 10.1016/j.jplph.2010.05.021.
13. Wei, M.Y., Chao, Y.Y., and Kao, C.H., NaCl-induced heme oxygenase in roots of rice seedlings is mediated through hydrogen peroxide. *Plant Growth Regul.*, 2013, vol. 69, pp. 209–14. doi: 10.1007/s10725-012-9762-7.
14. He, H., He, L., Heme oxygenase 1 and abiotic stresses in plants. *Acta Physiol. Plant.* 2014, vol. 36, pp. 581–8. doi: 10.1007/s11738-013-1444-1.
15. Verma, K., Dixit, S., Shekhawat, G.S., and Alam, A., Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress. *Turk. J. Biol.*, 2015, vol. 39, pp. 540–9. doi: 10.3906/biy-1501-28.
16. Bai, X., Chen, J., Kong, X., Todd, C.D., Yang, Y., Hu, X., and Li, D.Z., Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis. *Free Radica. Biol. Med.*, 2012, vol. 53, pp. 710–20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.042.
17. 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, vol. 19, no. 1, 188. doi: 10.3390/ijms19010188.
18. Ling, T., Zhang, B., Cui, W., Wu, M., Lin, J., Zhou, W., Huang, J., and 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, vol. 177, no. 4, pp. 331–40. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.06.004.
19. Meng, D.K., Chen, J., and Yang, Z.M., Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbon monoxide. *J. Hazardous Materials*, 2011, vol. 186, no. 2–3, pp. 1823–29. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.062.
20. Li, Z.G., Gu, S.P., Hydrogen sulfide as a signal

- molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biol. Plant.*, 2016, vol. 60, no. 3, pp. 595–600. doi: 10.1007/s10535-016-0612-8.
21. Yuan, X.X., Wang, J., Xie, Y.J., and Shen, W.B., Effects of carbon monoxide on salt tolerance and proline content of roots in wheat seedling. *Plant Physiol. Commun.*, 2009, vol. 45, no. 6, pp. 567–70.
 22. 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, vol. 50, no. 12, pp. 1539–48. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x.
 23. Gyan'ko, A.K., Ischenko, A.A., Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 5, pp. 463–71. doi: 10.1134/S0003683810050017.
 24. Sharova, E.I., Medvedev, S.S., Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2017, vol. 64, no. 1, pp. 1–14. doi: 10.1134/S1021443717010149.
 25. Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R.P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., Buck, F., and Böttger, M., Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.*, 2009, vol. 32, no. 5, pp. 497–508. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x.
 26. Xuan, W., Huang, L., Li, M., Huang, B., Xu, S., Liu, H., Gao, Y., and 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, vol. 52, no.1, pp. 41–51. doi: 10.1007/s10725-007-9175-1.
 27. Wilkinson, W.J., Kemp, P.J. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J. Physiol.*, 2011, vol. 589, no. 13, pp. 3055–62. doi: 10.1113/jphysiol.2011.206706.
 28. Sa, Z.S., Huang, L.Q., Wu, G.L., Ding, J.P., Chen, X.Y., Yu, T., Ci, S., and Shen, W.B., Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves. *J. Integr. Plant Biol.*, 2007, vol. 49, no. 5, pp. 638–45. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00461.x.
 29. Hsu, Y.Y., Chao, Y.Y., and Kao, C.H., Cobalt chloride-induced lateral root formation in rice: the role of heme oxygenase. *J. Plant Physiol.*, 2013, vol. 170, no. 12, pp. 1075–81. doi: 10.1016/j.jplph.2013.03.004.
 30. Hsu, Y.Y., Chao, Y.Y., and Kao, C.H., Methyl jasmonate-induced lateral root formation in rice: The role of heme oxygenase and calcium. *J. Plant Physiol.*, 2013, vol. 170, no. 1, pp. 63–9. doi: 10.1016/j.jplph.2012.08.015.
 31. Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M., and Kuchitsu, K., Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 14, pp. 8885–92. doi: 10.1074/jbc.M708106200.
 32. Gazaryan, I.G., Khushpul'yan, D.M., and Tishkov, V.I., Structural features and mechanism of action plant peroxidasis. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii*, 2006, vol. 46, pp. 303–22.
 33. Demidchik, V., Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In: *Plant Stress Physiology*, ed. S. Shabala. CAB International, 2012, pp. 24–58. doi: 10.1079/9781845939953.0024.
 34. Shkliarevskiy, M.A., Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V., Shvidenko, M.V., and Dmitriev, O.P., Influence of carbon monoxide (CO) donor on heat resistance of wheat plantlets and generation of reactive oxygen species by them. *Dopov. Nac. Akad. Nauk Ukr.*, 2020, no. 8, pp. 73–80. doi: org/10.15407/dopovidi.2020.08.073.
 35. Kolupaev, Yu.E., Oboznyi, A.I., and Shvidenko, N.V., Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2013, vol. 60, no. 2, pp. 227–34. doi: 10.1134/S102144371302012X.
 36. Minibayeva, E.V., Gordon, L.K., Kolesnikov, O.P., and Chasov A.V., Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*, 2001, vol. 217, no. 1–3, pp. 125–28. doi: 10.1007/BF01289421.
 37. Sagisaka, S., The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.*, 1976, vol. 57, no. 2, pp. 308–9. doi: 10.1104/pp.57.2.308.
 38. Karpets, Yu.V., Kolupaev, Yu.E., Yastreb, T.O., and Oboznyi A.I., Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2015, vol. 62, no. 3, pp. 292–8. doi: 10.1134/S1021443715030097.
 39. Melekhov, E.I., Efremova, L.K., Effect of phytohormones on plant cell stability to heating and to 2,4-D treatments. *Fiziologiya Restenii*, 1990, vol. 37, no. 3, pp. 561–8.
 40. Bolwell, G.P., Wojtaszek, P., Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1997, vol. 51, no. 6, pp. 347–66. doi: 10.1006/pmpp.1997.0129.
 41. Kolupaev, Yu.E., Akinina, G.E., Mokrousov, A.V., Induction of heat tolerance in wheat coleoptiles by calcium ions and its relation to oxidative stress. *Russ.*

- J. Plant Physiol.*, 2005, vol. 52, no. 2, pp. 199–204. doi: 10.1007/s11183-005-0030-9.
42. Chasov, A.V., Alekseeva, V.Y., Kolesnikov, O.P., Minibayeva F.V., Activation of extracellular peroxidase of wheat roots under the action of xenobiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 4, pp. 431–7. doi: 10.1134/S0003683810040125.
43. Maksimov, I.V., Troshina, N.B., Surina O.B., Cherpanova E.A., and Yarullina L.G., Influence of Ca^{2+} ions on metabolism of active oxygen species in wheat calli cocultured with the bunt pathogen *Tilletia caries*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, Vol. 46, no. 5, pp. 530–5. doi: 10.1134/S000368381005011X.
44. Bakardjieva, N.T., Izvorska, N.D., and Hristova, N., Influence of Ca^{2+} on the activity and release of peroxidase from Tobacco callus tissues, *Dokl. Bulg. AN*, 1987, vol. 40, no. 8, pp. 84–8.
45. Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V., and Kabashnikova, L.F., Antioxidative system of plants: Cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2019, vol. 55, no. 5, pp. 441–59. doi: 10.1134/S0003683819050089.
46. Hu, X., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, A., Lin, F., and Tan, M., Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H_2O_2 production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol.*, 2007, vol. 173, no. 1, pp. 27–38. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01888.x.
47. Niu, L., Liao W., Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Front. Plant Sci.* 2016, vol. 7, 230. doi: 10.3389/fpls.2016.00230.
48. Liu, Y., Xu, S., Ling, T., Xu, L., and 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, vol. 167, no. 16, pp. 1371–9. doi: 10.1016/j.jplph.2010.05.021.

Поступила в редакцию 13.06.20

После доработки 10.07.20

Принята к публикации 18.11.20