

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КАДАВЕРИНА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ И ЕГО СВЯЗЬ С ДРУГИМИ СИГНАЛЬНЫМИ ПОСРЕДНИКАМИ

© 2022 г. А. И. Кокорев^а, М. А. Шкляревский^б, Ю. Е. Колупаев^{а, б, *}

^аИнститут растениеводства им. В. Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина

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

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

Поступила в редакцию 21.12.2021 г.

После доработки 25.12.2021 г.

Принята к публикации 25.12.2021 г.

Изучали влияние экзогенного кадаверина на теплоустойчивость этилированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и возможную роль оксида азота, пероксида водорода и ионов кальция в проявлении его стресс-протекторного действия. Обработка корней интактных проростков 1 мМ кадаверином повышала их выживание после повреждающего прогрева (45°C, 10 мин). При этом отмечалось транзитное увеличение содержания в корнях оксида азота и пероксида водорода. Повышения количества NO в корнях проростков не происходило в присутствии ингибитора окислительного пути синтеза оксида азота аминогуанидина. Также влияние кадаверина на содержание NO в корнях проростков уменьшалось при обработке скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевинной и ингибитором поступления кальция в цитозоль неомицином. При этом эффект повышения кадаверином содержания пероксида водорода в корнях частично устранялся антагонистами NO и модуляторами кальциевого гомеостаза. Обработка проростков диметилтиомочевинной, антагонистами NO и кальция снижала стресс-протекторное действие экзогенного кадаверина. Сделано заключение о роли NO и его функциональных связей с АФК и ионами кальция в процессе повышения теплоустойчивости проростков пшеницы кадаверином.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, полиамины, кадаверин, оксид азота, пероксид водорода, кальций, теплоустойчивость

DOI: 10.31857/S001533032204008X

ВВЕДЕНИЕ

Полиамины – алифатические амины, существующие в форме поликатионов, обнаружены в различных клетках эукариот и прокариот [1, 2]. В обычных условиях у высших растений их содержание в тканях близко к содержанию гормонов – 10^{-9} – 10^{-5} М [3]. Однако при действии стрессовых факторов различной природы оно может увеличиваться в несколько раз и даже на порядок [4]. В связи с этим полиамины относят к группе стрессовых метаболитов. На их роль в устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды указывает не только стресс-индуцированный синтез, но и зарегистрированные во многих работах защитные эффекты экзогенных полиаминов [5, 6].

Также установлено, что трансформация растений генами, причастными к синтезу полиаминов, повышает их устойчивость к действию абиотических стрессоров [7], а трансгенные растения с угнетением метаболических путей синтеза полиаминов проявляют повышенную чувствительность к действию неблагоприятных факторов [8].

Наиболее распространенными полиаминами растений являются путресцин, спермидин и спермин [9]. Они найдены практически во всех компартментах растительной клетки [3]. Менее изученным полиамином растений является кадаверин. Эндогенный кадаверин обнаружен у ряда видов растений, включая пшеницу, рис, кукурузу и бобовые [10, 11], хотя его абсолютное содержание у растений обычно ниже по сравнению с количеством других полиаминов [12]. Обнаружено увеличение количества кадаверина в листьях фасоли [13] и корнях хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) [14] при действии высоких

Сокращения: РТИО – 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide; ДМТМ – диметилтиомочевина; МДА – малоновый диальдегид; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СОД – супероксиддисмутаза.

температур. У хрустальной травки также зарегистрировано повышение содержания кадаверина при солевом стрессе [15].

Однако сведений о влиянии экзогенного кадаверина на устойчивость растений к стресс-факторам пока недостаточно. Обнаружено усиление прорастания семян редиса при 38°C при обработке 10 мкМ кадаверина [16]. В наших исследованиях показано повышение теплоустойчивости проростков пшеницы и активности антиоксидантных ферментов под влиянием кадаверина в диапазоне концентраций 0.25–2.50 мМ [17].

Стресс-протекторные эффекты полиаминов связывают с их стабилизирующим влиянием на белки, нуклеиновые кислоты и мембранные структуры, обусловленным их катионным состоянием в физиологических условиях [3]. Наряду с этим участие полиаминов в защите растений от неблагоприятных воздействий может быть обусловлено их прямым антиоксидантным действием [18].

Катаболизм полиаминов с участием ди- и полиаминоксидаз приводит к образованию в апопласте и пероксисомах пероксида водорода [19] – важной сигнальной молекулы [20]. Еще одним вероятным сигнальным посредником, вовлеченным в реализацию действия полиаминов, является оксид азота (NO). Усиление генерации NO под влиянием экзогенных полиаминов показано у разных видов растений [21–23], однако механизм этого эффекта остается не ясным [24]. При этом данные о влиянии различных полиаминов на синтез NO у растений разных видов весьма противоречивы. Например, показано, что у проростков томата содержание оксида азота повышалось под влиянием спермидина, но не путресцина [22]. В то же время на суспензионной культуре семядолей сои показано, что наиболее заметное усиление синтеза NO вызывал путресцин [21]. Такой эффект сопровождался повышением активности диаминоксидазы, а также содержания пероксида водорода в клетках. При этом каталаза и скавенджер пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ) устраняли эффект усиления генерации NO, вызываемый путресцином [21]. Однако в наших экспериментах с использованием корней интактных проростков пшеницы показано, что обработка антиоксидантом ДМТМ лишь немного уменьшала эффект повышения содержания NO, вызываемый путресцином [23]. В то же время скавенджер NO РГИО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide) значительно нивелировал повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при их обработке путресцином. Таким образом, можно полагать, что между NO и пероксидом водорода как посредниками в реализации эффектов полиаминов существуют прямые и обратные связи и их проявление

может отличаться в зависимости от вида растений и экспериментальных условий.

Участие оксида азота в реализации физиологических (стресс-протекторных) эффектов кадаверина до сих пор не изучено. Достаточно давно установлено, что окислительная деградация этого диамина, как и других полиаминов, сопровождается повышением содержания пероксида водорода в тканях растений [25]. При этом, однако, влияние кадаверина на редокс-гомеостаз растительных клеток может существенно отличаться от эффектов других полиаминов, например, путресцина. Так, обнаружено, что индукция кадаверином экспрессии гена цитоплазматической супероксиддисмутазы (Cu/Zn-СОД) в корнях хрустальной травки не связана с его окислением диаминоксидазой и образованием пероксида водорода [26]. В корнях проростков пшеницы вызываемое кадаверином повышение активности СОД не устранялось ингибиторами диаминоксидазы и НАДФН-оксидазы, а также ДМТМ [17]. В то же время указанные ингибиторы устраняли подобные эффекты путресцина, также изученные с использованием интактных корней пшеницы [27].

Обнаруженное при действии путресцина повышение содержания АФК и NO в тканях корней проростков пшеницы зависело от поступления кальция в цитозоль [23, 28]. Однако участие кальция в реализации физиологических эффектов кадаверина до сих пор не исследовано.

В связи с вышеизложенным, целью работы было изучить влияние кадаверина на образование оксида азота в корнях проростков пшеницы и выявить взаимосвязь между NO, АФК и кальцием как сигнальными посредниками при повышении теплоустойчивости проростков под действием этого диамина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала (оригинатор – Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН Украины, репродукция 2020 г.). Зерновки в течение 30 мин обеззараживали в 6% растворе пероксида водорода и после тщательного промывания дистиллированной водой проращивали в темноте в течение трех суток в чашках Петри на дистиллированной воде при температуре 20–22°C, после чего в среду добавляли кадаверин в концентрации 1 мМ и выдерживали проростки на его растворе в течение суток, проростки контрольного варианта продолжали инкубировать на дистиллированной воде. Концентрация кадаверина, вызывающая максимальное повышение теплоустойчивости проростков, была установлена ранее [17].

При изучении влияния скавенджера NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide – 0.1 мМ), ингибитора диаминоксидазы амингуанидина (1 мМ) [29], ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия (2 мМ) [23], скавенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ – 0.15 мМ) [23], ингибитора НАДФН-оксидазы 10 мкМ имидазола [17], а также хелатора внеклеточного кальция ЭГТА (0.5 мМ) и 0.2 мМ неомидина – ингибитора образования инозитол-1,4,5-фосфата в реакции, катализируемой фосфолипазой С [28], инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке комбинированного действия кадаверина и антагонистов сигнальных посредников последние вносили в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее кадаверина. Концентрации указанных соединений, максимально модулирующие изучаемые эффекты, но не проявляющие видимого токсического действия, были установлены в опытах, проведенных нами ранее на такой же экспериментальной модели [17, 27, 28].

После обработки проростков указанными соединениями их подвергали 10-минутному повреждающему нагреву в водяном термостате UTU-4 (“Ногузонт”, Польша) при температуре 45°C [17]. После прогрева проростки всех вариантов переносили на дистиллированную воду и выращивали при температуре 20–22°C, в течение первых суток после прогрева их инкубировали в темноте, а затем при освещении 90 Вт/м². Через 3 суток оценивали относительное количество выживших образцов, к которым относили проростки, не имеющие признаков некроза на листьях и сохраняющие способность к росту.

Для изучения биохимических показателей использовали корни, поскольку они более чувствительны к действию экзогенных соединений и повреждающего прогрева по сравнению с другими органами проростков [17, 30]. При исследовании влияния кадаверина на динамику содержания оксида азота и пероксида водорода образцы корней отбирали через 0.5, 1, 1.5, 2, 4 и 24 ч после начала инкубации.

Содержание оксида азота в корнях определяли с использованием реактива Грисса по методу, описанному в работе [31], с незначительными модификациями, подробно изложенными ранее [32].

Количество пероксида водорода в тканях анализировали ферроцианидным методом [33]. Для этого корни на льду гомогенизировали в 5% ТХУ, затем центрифугировали на центрифуге MPW 350R (“MPW MedInstruments”, Польша) при 8000 g при температуре 2–4°C, супернатант использовали для анализа.

Через сутки после повреждающего прогрева проростков визуализации их повреждений не наблюдалось, что позволяло использовать экспери-

ментальный материал для оценки содержания маркера окислительного стресса – продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно малоновый диальдегид, МДА) [34]. Для этого корни гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25% 2-тиобарбитуровую кислоту в 10% ТХУ. Гомогенат помещали в кипящую баню на 30 мин, затем охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта определяли при 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое поглощение, которое вычитается из результата) [34].

Эксперименты, которые включали в себя биохимические анализы, проводили в 4-кратной биологической повторности и, как минимум дважды, воспроизводили их независимо. В опытах по оценке выживания проростков каждая проба состояла не менее чем из 30 проростков. Эксперименты с такими образцами проводили в 4–5-кратной повторности и также 2–3 раза воспроизводились независимо. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$, обозначены разными латинскими буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика содержания оксида азота и пероксида водорода в корнях при их обработке кадаверином

В корнях контрольного варианта содержание оксида азота в течение наблюдений существенно не изменялось. Обработка корней интактных проростков кадаверином вызывала повышение содержания NO в тканях, которое значимо проявлялось уже через 0.5 ч после начала воздействия диамина (рис. 1а). Максимальный эффект отмечался через 1–2 ч от начала инкубации корней. К 4 ч содержание NO в опытном варианте снижалось, а через 24 ч не отличалось от контроля.

Динамика содержания пероксида водорода в корнях проростков была похожей на таковую для NO (рис. 1б). В контрольном варианте его количество существенно не изменялось. В ответ на обработку кадаверином повышение содержания H₂O₂ в корнях наблюдали уже через 0.5 ч от ее начала, а через 1.5–2 ч его количество достигало максимума (рис. 1б). Через 24 ч после начала обработки корней кадаверином содержание пероксида водорода, наоборот, несколько снижалось.

Влияние модуляторов сигнальных процессов на повышение содержания NO в корнях проростков, вызванное кадаверином

Обработка проростков ингибитором диаминоксидазы амингуанидином вызывала некото-

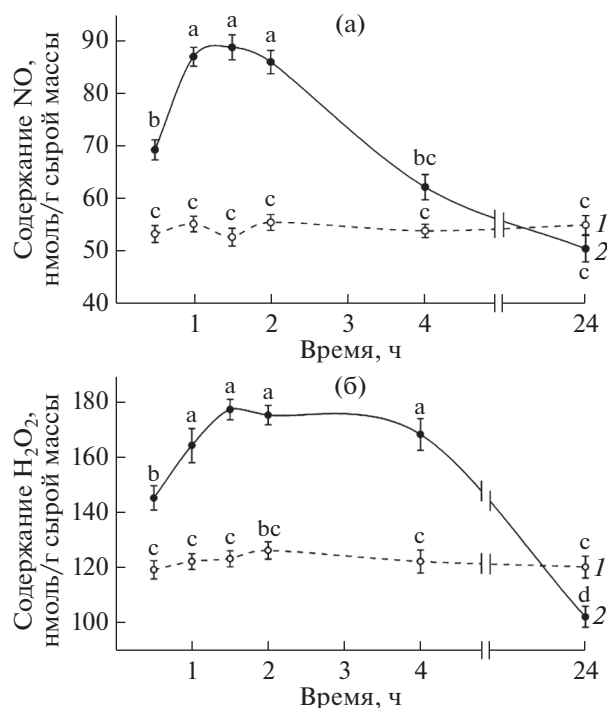


Рис. 1. Динамика содержания NO (а) и пероксида водорода (б) в корнях проростков пшеницы при действии кадаверина. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ). Разными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$.

рое снижение содержания NO в корнях и почти полностью устраняла эффект повышения количества оксида азота, вызываемый кадаверином (рис. 2). В то же время ингибитор нитратредуктазы вольфрамат натрия как сам по себе, так и в присутствии кадаверина почти не влиял на содержание NO в корнях.

Обработка проростков скавенджером пероксида водорода ДМТМ сама по себе не влияла на содержание оксида азота, хотя вызывала относительно небольшое его снижение в варианте с кадаверином (рис. 2). Ингибитор фермента, генерирующего АФК – НАДФН-оксидазы, имидазол не оказывал влияния на содержание NO в корнях проростков пшеницы, также обработка этим ингибитором не сказывалась на содержании оксида азота в варианте с воздействием кадаверина (рис. 2).

При обработке проростков антагонистами кальция, неомицином и ЭГТА, содержание NO в корнях не изменялось. При этом неомицин, ингибирующий зависимое от фосфолипазы С поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов, заметно нивелировал повышение содержания NO, вызываемое обработкой корней кадаверином (рис. 2). В то же время хелатор внеклеточного кальция ЭГТА практически не влиял на этот эффект.

Модификация влияния кадаверина на содержание пероксида водорода в корнях проростков их обработкой антагонистами АФК, оксида азота и кальция

Обработка проростков ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом сама по себе несколько снижала содержание пероксида водорода в корнях (рис. 3). Этот ингибитор на небольшую, но достоверную при $P \leq 0.05$ величину уменьшал проявление влияния кадаверина на содержание пероксида водорода. Ингибитор диаминооксидазы аминоксидина и скавенджер NO РТЮ в отсутствие кадаверина не изменяли содержание пероксида водорода в корнях, но в то же время значительно уменьшали влияние этого диаминна на количество H₂O₂ (рис. 3). При обработке корней ингибитором нитратредуктазы вольфрамом натрия содержание пероксида водорода в них не изменялось. Не изменяла обработка проростков этим ингибитором и проявление влияния кадаверина на содержание H₂O₂ в корнях.

В присутствии кальциевых антагонистов неомицина и ЭГТА содержание пероксида водорода в корнях существенно не изменялось. В то же время как хелатор внеклеточного кальция ЭГТА, так и ингибитор фосфолипазы С неомицин, частично устраняли проявление влияния кадаверина на содержание H₂O₂ (рис. 3).

Влияние модуляторов содержания АФК, NO и кальция на проявление стресс-протекторного эффекта кадаверина на проростки пшеницы при гипертермии

Обработка проростков кадаверином значительно уменьшала вызываемый повреждающим прогревом эффект накопления в тканях корней продукта ПОЛ МДА (рис. 4а). Скавенджер NO РТЮ сам по себе не влиял на проявление процесса ПОЛ после гипертермического воздействия на проростки, но при этом он полностью снимал протекторный эффект кадаверина. Ингибитор диаминооксидазы аминоксидина не оказывал влияния на интенсивность ПОЛ после теплового стресса, однако, как и РТЮ, устранял защитное действие кадаверина. В то же время ингибитор нитратредуктазы вольфрамат натрия не влиял на проявление протекторного действия диаминна (рис. 4б).

Скавенджер пероксида водорода ДМТМ существенного влияния на содержание МДА в корнях проростков после повреждающего прогрева не оказывал, однако, частично нивелировал вызываемый кадаверином эффект снижения интенсивности ПОЛ (рис. 4а). Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сам по себе не оказывал влияния на количество МДА в корнях, а также не влиял на прояв-

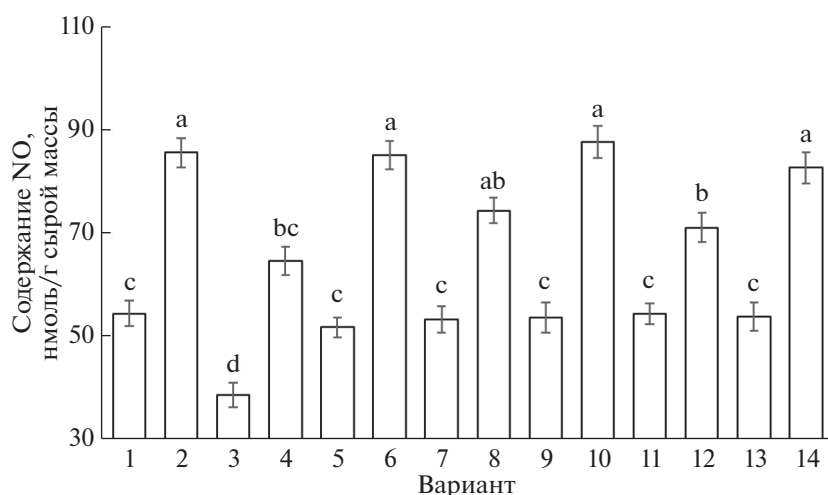


Рис. 2. Содержание NO в корнях проростков пшеницы при обработке кадаверином, антагонистами оксида азота, АФК и кальция. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – амингуанидин (1 мМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + амингуанидин (1 мМ); 5 – вольфрамат натрия (2 мМ); 6 – вольфрамат натрия (2 мМ) + кадаверин (1 мМ); 7 – ДМТМ (0.15 мМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 9 – имидазол (0.01 мМ); 10 – кадаверин (1 мМ) + имидазол (0.01 мМ); 11 – неомидин (0.2 мМ); 12 – кадаверин (1 мМ) + неомидин (0.2 мМ); 13 – ЭГТА (0.5 мМ); 14 – кадаверин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ). Разными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$. Примечание. Содержание NO в корнях определяли через 1.5 ч после начала обработки кадаверином и/или через 3 ч от начала обработки другими соединениями.

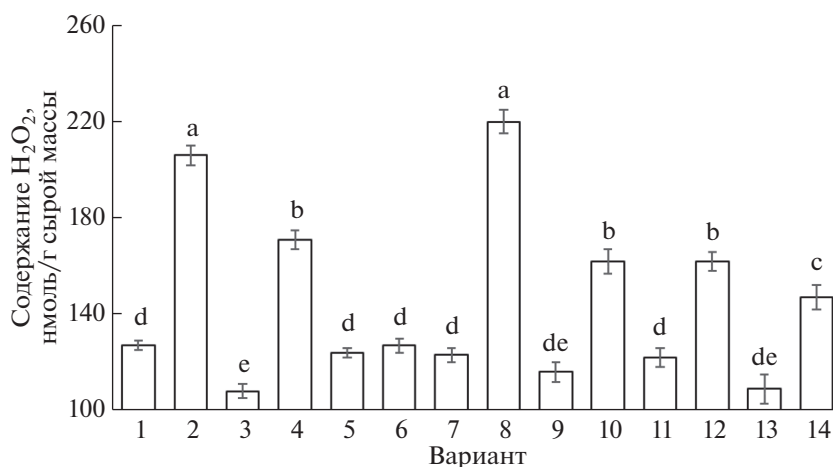


Рис. 3. Содержание пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при обработке кадаверином, антагонистами АФК, оксида азота и кальция. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – имидазол (0.01 мМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + имидазол (0.01 мМ); 5 – амингуанидин (1 мМ); 6 – кадаверин (1 мМ) + амингуанидин (1 мМ); 7 – вольфрамат натрия (2 мМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 9 – РТЮ (0.1 мМ); 10 – кадаверин (1 мМ) + РТЮ (0.1 мМ); 11 – неомидин (0.4 мМ); 12 – кадаверин (1 мМ) + неомидин (0.2 мМ); 13 – ЭГТА (0.5 мМ); 14 – кадаверин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ). Разными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$. Примечание. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 1.5 ч после начала обработки кадаверином и/или через 3 ч от начала обработки другими соединениями.

ление действия кадаверина на этот показатель после повреждающего прогрева.

Ингибиторы поступления кальция в цитозоль – неомидин и ЭГТА – не оказывали влияния на эффект повышения содержания МДА в корнях, вызываемый повреждающим нагревом. При этом оба соединения почти полностью устраняли эф-

фект смягчения окислительного стресса, вызываемый кадаверином (рис. 4а).

Под влиянием кадаверина существенно повышалось выживание проростков после повреждающего прогрева (рис. 4б). Скавенджер NO РТЮ почти не влиял на теплоустойчивость проростков, но полностью снимал защитное действие кадавери-

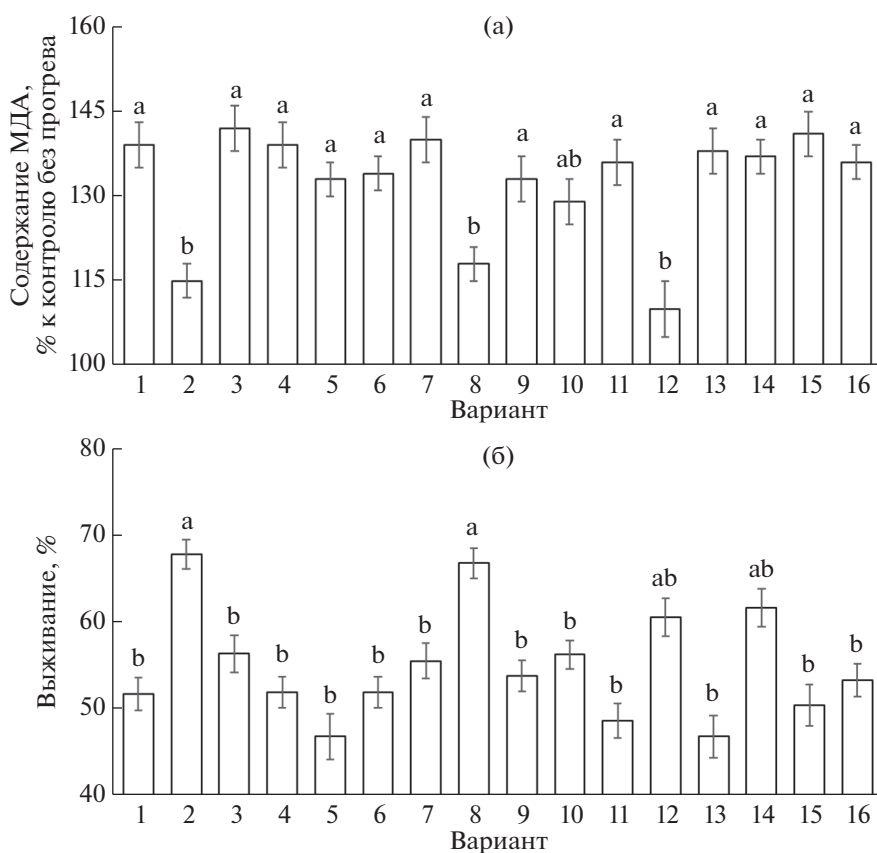


Рис. 4. Содержание МДА в корнях (а) и выживание проростков пшеницы (б) после повреждающего прогрева. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – РГЮ (0.1 мМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + РГЮ (0.1 мМ); 5 – аминоксантидин (1 мМ); 6 – кадаверин (1 мМ) + аминоксантидин (1 мМ); 7 – вольфрамат натрия (2 мМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 9 – ДМТМ (0.15 мМ); 10 – кадаверин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 11 – имидазол (0.01 мМ); 12 – кадаверин (1 мМ) + имидазол (0.01 мМ); 13 – неомицин (0.2 мМ); 14 – кадаверин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ); 15 – ЭГТА (0.5 мМ); 16 – кадаверин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ). Разными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$. Примечание. Содержание МДА определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 суток после повреждающего прогрева.

на. Также положительное действие кадаверина на теплоустойчивость проростков не проявлялось в присутствии ингибитора синтеза NO по окислительному пути аминоксантидина, который сам по себе существенного влияния на терморезистентность не оказывал. В то же время обработка проростков ингибитором нитратредуктазы вольфраматом натрия не влияла на проявление эффектов кадаверина.

Воздействие на проростки скавенджера пероксида водорода ДМТМ не оказывало заметного влияния на их теплоустойчивость, но в значительной степени нивелировало влияние кадаверина на выживание проростков (рис. 4б). Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол также сам по себе не влиял на теплоустойчивость проростков, а в сочетании с кадаверином лишь незначительно уменьшал проявление его защитного действия.

Антагонисты кальция неомицин и ЭГТА в отсутствие обработки проростков кадаверином су-

щественно не влияли на их теплоустойчивость. При этом оба кальциевых антагониста в значительной степени нивелировали вызываемый кадаверином эффект повышения выживания проростков после теплового стресса (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении оксида азота в реализацию протекторного действия экзогенного кадаверина на проростки пшеницы при тепловом стрессе. На это указывает эффект транзитного повышения содержания NO в течение нескольких первых часов после начала обработки проростков кадаверином (рис. 1а). Усиление синтеза NO, вызываемое кадаверином, устранялось аминоксантидином – ингибитором ферментов окислительного пути образования NO (диаминоксидазы и NO-синтазы), но не вольфраматом натрия – ингибитором нитра-

тредуктазы, фермента восстановительного пути синтеза NO.

При этом сквенджер NO РТЮ и ингибитор его синтеза амингуанидин почти полностью устраняли стресс-протекторные эффекты кадаверина. Эти соединения снимали вызываемое кадаверином смягчение эффекта окислительного стресса, происшедшего после действия повреждающей температуры (рис. 4а). Также выживание проростков после прогрева в вариантах с сочетанным влиянием кадаверина и РТЮ или амингуанидина было значительно ниже, чем при действии только кадаверина (рис. 4б). В то же время ингибитор нитратредуктазы вольфрамат натрия не влиял на защитное действие кадаверина, проявлявшееся в смягчении эффекта окислительного стресса и в повышении выживания проростков после повреждающего нагрева (рис. 4). Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о наличии связи между вызываемым кадаверином увеличением содержания оксида азота в клетках и повышением теплоустойчивости проростков.

Как уже отмечалось, эффекты повышения содержания оксида азота в растительных тканях под влиянием полиаминов зарегистрированы в ряде исследований, проведенных на растениях различных таксономических групп [23, 24, 35]. Однако действие кадаверина на содержание NO в тканях растений до сих пор оставалось не исследованным.

Какой именно фермент катализирует синтез NO, усиливаемый экзогенными полиаминами, полностью не ясно, по крайней мере, в отношении кадаверина. Вызываемое спермидином и спермином повышение содержания оксида азота у томатов сопровождалось одновременным повышением активностей диаминоксидазы, полиаминоксидазы и нитратредуктазы [36]. На растениях *Arabidopsis* показано, что мутанты, дефектные по гену, кодирующему диаминоксидазу CuAO1, отличались более низкой продукцией NO по сравнению с растениями дикого типа [37]. Результаты, полученные нами в отношении кадаверина, позволяют полагать, что доминирующую роль в образовании NO при обработке этим диамином проростков пшеницы играет окислительный путь, поскольку эффект кадаверина устранялся амингуанидином, но не вольфраматом натрия (рис. 2). Наиболее вероятно, что к образованию NO в этом случае причастна диаминоксидаза, которая легко ингибируется действием амингуанидина [23]. Нельзя, однако, и полностью исключить вклад фермента, функционально подобного NO-синтазе животных, поскольку имеются данные о его ингибировании амингуанидином [29].

В целом же механизм усиления синтеза NO в клетках растений под влиянием полиаминов остается неясным не только в отношении кадаве-

рина, но и более изученных полиаминов [24]. Можно полагать, что изменение количества оксида азота в клетках зависит от содержания ионов кальция и АФК. Так, в условиях наших экспериментов повышение содержания NO в корнях, вызываемое кадаверином, уменьшалось под влиянием неомидина, ограничивающего поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов (рис. 2). В то же время хелатор внеклеточного кальция не оказывал влияния на повышение содержания NO при обработке проростков кадаверином. Вероятно, что вклад кальций-зависимого изменения содержания NO в клетках может быть различным, в зависимости от природы полиамина. Так, в наших исследованиях, проведенных ранее на той же экспериментальной модели (интактных корнях проростков) в отношении путресцина, показана более существенная зависимость повышения содержания NO в клетках от кальциевого гомеостаза, в том числе от его поступления из внеклеточного пространства [23].

Посредниками, тесно связанными как с NO, так и с кальцием и задействованными в реализации физиологических эффектов полиаминов являются АФК, в частности пероксид водорода [20, 32, 38]. Следует отметить, что в работе Kuznetsov и соавт. [25] было зарегистрировано значительное увеличение содержания пероксида водорода в корнях взрослых растений *Mesembryanthemum crystallinum* при окислительной деградации экзогенного кадаверина и устранение такого эффекта ингибитором диаминоксидазы амингуанидином.

Как показали результаты наших исследований, характер изменения содержания H_2O_2 в корнях проростков был очень похож на таковой для NO (рис. 1). При этом динамика изменения содержания двух этих посредников не позволяет заключить, содержание какого из них под влиянием кадаверина повышается быстрее. Максимальное повышение обоих посредников происходило через 1.5 ч после начала обработки интактных корней кадаверином. Ингибиторный анализ также не дает оснований для однозначных заключений о расположении H_2O_2 и NO в сигнальной цепи. Так, вызываемое кадаверином увеличение содержания пероксида водорода частично снималось сквенджером NO РТЮ, в то же время эффект повышения содержания оксида азота немного снижался в присутствии сквенджера пероксида водорода ДМТМ (рис. 2, 3). Вполне вероятно, что оба процесса – повышение содержания как H_2O_2 , так и NO – зависят от активности диаминоксидазы. На это указывает нивелирование обоих эффектов ингибитором диаминоксидазы амингуанидином (рис. 2, 3). В то же время в присутствии ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола содержание пероксида водорода изменялось слабо (рис. 3), а количество оксида азота в варианте с сочетанным дей-

ствием кадаверина и имидазола не отличалось от такового в варианте с одним кадаверином (рис. 2). Также на процессы генерации NO и H₂O₂, активируемые кадаверином, совершенно не влиял ингибитор нитратредуктазы вольфрамат натрия (рис. 2, 3).

Вызываемое кадаверином изменение содержания пероксида водорода в корнях модифицировалось обоими используемыми антагонистами кальция (рис. 3). Как уже отмечалось, неомистин заметно снижал и эффект усиления генерации NO, вызываемый кадаверином (рис. 2). Таким образом, усиление образования пероксида водорода и оксида азота зависело от кальциевого гомеостаза. Следует подчеркнуть, что влияние кадаверина на кальциевый гомеостаз растительных клеток до сих пор практически не изучено. Хотя показано значение цитозольного кальция в реализации физиологических эффектов другого диамина – путресцина [19, 39].

Таким образом, в целом, полученные результаты свидетельствуют о вовлечении оксида азота в реализацию стресс-протекторного действия кадаверина на проростки пшеницы при гипертермии, а также о его функциональном взаимодействии с пероксидом водорода и ионами кальция. На это указывает нивелирование (по крайней мере, частичное) влияния кадаверина на такие интегральные процессы, как ПОЛ и выживание проростков после теплового стресса скавенджерами NO (РТЮ) и пероксида водорода (ДМТМ), а также антагонистами кальция – неомистином и ЭГТА (рис. 4). При этом ключевым ферментом, задействованным в усилении образования под влиянием кадаверина пероксида водорода и, возможно, оксида азота, является диаминооксидаза. Ее ингибитор аминогуанидин устранял проявление влияния кадаверина на все изучаемые процессы: генерацию пероксида водорода и оксида азота (рис. 2, 3), уровень ПОЛ и выживание проростков после повреждающего нагрева (рис. 4). Тем не менее, механизмы влияния кадаверина на синтез оксида азота остаются неясными и требуют специальных исследований. В частности, пока остается открытым вопрос о возможности прямого образования оксида азота при окислительной дегградации кадаверина диаминооксидазой. Следует отметить, что этот вопрос не решен и в отношении катаболических превращений более изученного диамина – путресцина [37, 40].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pal M., Szalai G., Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling // *Plant Sci.* 2015.

V. 237. P. 16.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003>

2. Liu W., Tan M., Zhang C., Al E. Functional characterization of murB-potABCD operon for polyamine uptake and peptidoglycan synthesis in *Streptococcus suis* // *Microbiol. Res.* 2017. V. 207. P. 177.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.008>
3. Kuznetsov V.I., Radyukina N.L., Shevyakova N.I. Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. V. 53. P. 583.
<https://doi.org/10.1134/S1021443706050025>
4. Gill S.S., Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants // *Plant Signal. Behav.* 2010. V. 5. P. 26.
<https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291>
5. Jing J., Guo S., Li Y., Li W. The alleviating effect of exogenous polyamines on heat stress susceptibility of different heat resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 7467.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64468-5>
6. Luo L., Li Z., Tang M.Y., Cheng B.Z., Zeng W.H., Peng Y., Nie G., Zhang X.Q. Metabolic regulation of polyamines and γ -aminobutyric acid in relation to spermidine-induced heat tolerance in white clover // *Plant Biol. (Stuttg.)*. 2020. V. 22. P. 794.
<https://doi.org/10.1111/plb.13139>
7. Seo S.Y., Kim Y.J., Park K.Y. Increasing polyamine contents enhanced the stress tolerance via reinforcement of antioxidative properties // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1331.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01331>
8. Mellidou I., Karamanoli K., Constantinidou H.I.A., Roubelakis-Angelakis K.A. Antisense-mediated S-adenosyl-L-methionine decarboxylase silencing affects heat stress responses of tobacco plants // *Funct. Plant Biol.* 2020. V. 47. P. 651.
<https://doi.org/10.1071/FP19350>
9. Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9. P. 1945.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
10. Tomar P.C., Lakra N., Mishra S. Cadaverine: a lysine catabolite involved in plant growth and development // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. P. e25850.
<https://doi.org/10.4161/psb.25850>
11. Jancewicz A.L., Gibbs N.M., Masson P.H. Cadaverine's functional role in plant development and environmental response // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 870.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00870>
12. Sharma L., Priya M., Kaushal N., Bhandhari K., Chaudhary S., Dhankher O.P., Prasad P.V.V., Siddique K.H.M., Nayyar H. Plant growth-regulating molecules as thermoprotectants: functional relevance and prospects for improving heat tolerance in food crops // *J. Exp. Bot.* 2020. V. 71. P. 569.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz333>
13. Edreva A., Yordanov I., Kardjieva R., Gesheva E. Heat shock responses of bean plants: involvement of free rad-

- icals, antioxidants and free radical active oxygen scavenging systems // *Biol. Plant.* 1998. V. 41. P. 185. <https://doi.org/10.1023/A:1001846009471>
14. *Shevyakova N.I., Rakitin V.Yu., Duong D.B., Sadomov N.G., Kuznetsov V.I.* Heat shock-induced cadaverine accumulation and translocation throughout the plant // *Plant Sci.* 2001. V. 161. P. 1125. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00515-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00515-5)
15. *Paramonova N.V., Shevyakova N.I., Shorina M.V., Stetsenko L.A., Rakitin V.Yu., Kuznetsov V.I.* The effect of putrescine on the apoplast ultrastructure in the leaf mesophyll of *Mesembryanthemum crystallinum* under salinity stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2003. V. 50. P. 587. <https://doi.org/10.1023/A:1025623704298>
16. *Cavusoglu K., Kabar K.* Comparative effects of some plant growth regulators on the germination of barley and radish seeds under high temperature stress // *Eur-Asian J. BioSci.* 2007. V. 1. P. 1.
17. *Kokorev A.I., Kolupaev Yu.E., Shkliarevskiy M.A., Lugovaya A.A.* The effect of cadaverine on redox homeostasis of wheat seedling roots and their resistance to damage heating // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya.* 2021. V. 54. P. 116. <https://doi.org/10.17223/19988591/54/6>
18. *Kumar N., Mallick S.* Ameliorative mechanisms of polyamines against abiotic stress in the rice plants // *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance* / Eds. Hasanuzzaman M., Fujita M., Nahar K., Biswas J. Elsevier Inc. All. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814332-2.00035-6>
19. *Pottosin I., Velarde-Buendía A.-M., Zepeda-Jazo I., Dobrovinskaya O., Shabala S.* Synergism between polyamines and ROS in the induction of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in roots // *Plant Signal. Behav.* 2012. V. 7. P. 1084. <https://doi.org/10.4161/psb.21185>
20. *Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.I.* Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
21. *Yang B., Wu J., Gao F., Wang J., Su G.* Polyamine-induced nitric oxide generation and its potential requirement for peroxide in suspension cells of soy-bean cotyledon node callus // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 79. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.025>
22. *Diao Q.-N., Song Y.-J., Shi D.-M., Qi H.-Y.* Nitric oxide induced by polyamines involves antioxidant systems against chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling // *J. Zhejiang Univ. Sci. B (Biomed. Biotechnol.).* 2016. V. 17. P. 916. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600102>
23. *Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Shkliarevskiy M.A., Lugovaya A.A., Karpets Yu.V., Ivanchenko O.E.* Role of NO synthesis modification in the protective effect of putrescine in wheat seedlings subjected to heat stress // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 384. <https://doi.org/10.1134/S0003683821030066>
24. *Kumar N., Gautam A., Dubey A.* Polyamines metabolism and NO signaling in plants // *Nitric Oxide in Plant Biology* / Eds. Singh V.P., Singh S., Tripathi D.K., Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M. Elsevier: Academic Press. 2022. P. 345. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00011-X>
25. *Kuznetsov V.I., Stetsenko L.A., Shevyakova N.I.* Exogenous cadaverine induces oxidative burst and reduces cadaverine conjugate content in the common ice plant // *J. Plant Physiol.* 2009. V. 166. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.01.010>
26. *Aronova E.E., Shevyakova N.I., Stetsenko L.A., Kuznetsov V.I.* Cadaverine-induced induction of superoxide dismutase gene expression in *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *Dokl. Biol. Sci.* 2005. V. 403. P. 257.
27. *Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I.* Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine // *Ukr. Biochem. J.* 2019. V. 91. P. 103. <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103>
28. *Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Shkliarevskiy M.A.* Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya.* 2020. V. 51. P. 105. <https://doi.org/10.17223/19988591/51/6>
29. *Glyan'ko A.K., Mitanova N.B., Stepanov A.V.* Influence of environmental factors on the generation of nitric oxide in the roots of etiolated pea seedlings // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 83. <https://doi.org/10.1134/S0003683812010061>
30. *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. <https://doi.org/10.1007/BF01289421>
31. *Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B.* Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis* // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 3223. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri319>
32. *Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Vayner A.A.* Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 65. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
33. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* 1976. V. 57. P. 308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
34. *Fazlieva E.R., Kiseleva I.S., Zhuikova T.V.* Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 333. <https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>

35. Kusano T., Sagor G.H.M., Berberich T. Molecules for sensing polyamines and transducing their action in plants // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1694. P. 25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_2
36. Recalde L., Mansur N.M.G., Cabrera A.V., Matayoshi C.L., Gallego S.M., Groppa M.D., Benavides M.P. Unravelling ties in the nitrogen network: Polyamines and nitric oxide emerging as essential players in signalling roadway // *Ann. Appl. Biol.* 2020. V. 178. P. 192. <https://doi.org/10.1111/aab.12642>
37. Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F. Copper amine oxidase 1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction // *Mol. Plant.* 2011. V. 4. P. 663. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr023>
38. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Dmitriev O.P. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide // *Cytol. Genet.* 2012. V. 46. P. 354. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
39. Singh P., Basu S., Kumar G. Polyamines metabolism: A way ahead for abiotic stress tolerance in crop plants // *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress in Plants* / Ed. Wani S.H. Elsevier Inc. 2018. P. 39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813066-7.00003-6>
40. Fraudentali I., Rodrigues-Pousada R.A., Angelini R., Ghuge S.A., Cona A. Plant copper amine oxidases: key players in hormone signaling leading to stress-induced phenotypic plasticity // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 5136. <https://doi.org/10.3390/ijms22105136>