

УДК 577.24

ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРОВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ГЛЮКОЗЫ НА ГИБЕЛЬ КЛЕТОК И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИСТЬЯХ ГОРОХА

© 2021 В.Д. Самуилов^{1*}, Д.Б. Киселевский^{1*}, Е.В. Дзюбинская¹, О.Ю. Фролова²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: vdsamuilov@mail.ru; dkiselevs@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, ООО «НИИ Митохондженирии МГУ», 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2021

После доработки 15.06.2021

Принята к публикации 15.06.2021

Исследовали действие ингибиторов супероксиддисмутазы (СОД) диэтилдитиокарбамата (ДДК), триэтилентетрамина (триена) и их комбинации с глюкозой на клетки эпидермиса из листьев гороха разного возраста: быстро растущих молодых листьев и старых листьев с замедленным ростом. ДДК и триен вызывали гибель устьичных клеток, которую регистрировали по разрушению их ядер. Глюкоза не влияла на разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД в клетках из старых листьев, но усиливала его в клетках из молодых листьев. Ингибитор гликолиза 2-дезоксиглюкоза и имитирующий СОД антиоксидант пропилгаллат подавляли зависимость от ингибиторов СОД и глюкозы разрушение ядер в клетках эпидермиса из молодых, но не из старых листьев. Глюкоза и триен стимулировали, а пропилгаллат уменьшал образование активных форм кислорода (АФК) в эпидермисе гороха, определяемое по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF). Протонофорный разобщитель окислительного и фотосинтетического фосфорилирования *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ) подавлял флуоресценцию DCF в устьичных клетках. Обработка клеток ХКФ с последующей отмывкой от него усиливала разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД и глюкозой. В молодых листьях ХКФ был менее эффективен, чем в старых. Полученные результаты демонстрируют эффекты ингибиторов СОД и глюкозы на гибель клеток и генерацию АФК и могут свидетельствовать о зависимости от гликолиза образовании АФК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкоза, супероксиддисмутазы, активные формы кислорода, программируемая клеточная смерть, устьичные клетки листьев, горох.

DOI: 10.31857/S032097252107006X

ВВЕДЕНИЕ

В регуляцию гибели клеток у растений вовлечены активные формы кислорода (АФК) [1]. Их образование ассоциировано с переносом электронов в электронтранспортных цепях митохондрий и хлоропластов. 1–2% потребляемого растениями O_2 превращается в АФК [2]. Представляет интерес вопрос о том, как системы энергообеспечения и образующиеся с их помощью АФК участвуют в гибели клеток растений. В связи с этим изучали, какой вклад вносят хлоропласты и митохондрии в процесс клеточной смерти [3, 4].

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДДК – N,N'-диэтилдитиокарбамат; СОД – супероксиддисмутазы; триен – триэтилентетрамин; ХКФ – *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA – диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина.

* Адресат для корреспонденции.

Роль хлоропластов в гибели клеток растений была продемонстрирована на клетках из эпидермиса листьев гороха [3]. В эпидермисе два типа клеток: основные эпидермальные клетки, которые не имеют хлоропластов, и фотосинтезирующие замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки). Освещение усиливало гибель устьичных клеток, но не влияло на гибель эпидермальных клеток, лишённых хлоропластов. Гибель устьичных клеток зависела как от АФК, так и от редокс-состояния пластохинона в хлоропластах [3].

Митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ подавляли образование АФК и гибель клеток в эпидермисе листьев гороха, что свидетельствует об участии митохондрий и митохондриальных АФК в гибели клеток растений [4, 5].

Ещё одним клеточным компартментом, генерирующим АФК, являются пероксисомы. Внутри них различные оксидазы катализируют образование H_2O_2 или супероксидного анион-

радикала (O_2^-), который затем превращается в H_2O_2 . Ферменты в мембране пероксисом (PMP, peroxisome membrane polypeptides) с молекулярной массой 18 (цитохром *b*), 29 и 32 кДа используют NADH или NADPH для восстановления кислорода до O_2^- в цитоплазме клеток [2].

Существует возможность образования АФК и в результате гликолиза, при котором происходит восстановление NAD^+ . Тот NAD^+ , который восстанавливается в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и регенерируется при окислении NADH дыхательной цепью, локализован в митохондриях и не доступен для ферментов, действующих в цитоплазме и других клеточных компартментах. NADH может функционировать в качестве донора электронов для пероксидазы и превращаться в радикал NAD^* , который окисляется кислородом с образованием АФК: $NAD^* + O_2 \rightarrow NAD^+ + O_2^-$ [6]. В связанном с гликолизом пентозофосфатном пути восстанавливается NADP⁺. Образующийся NADPH может окисляться NADPH-оксидазой плазматической мембраны, генерирующей O_2^- . Взаимодействие растений с патогеном инициирует гиперчувствительный ответ, который проявляется в локальной гибели клеток и образовании АФК NADPH-оксидазой плазматической мембраны для того, чтобы обезвредить инфекцию и не допустить её распространения. При этом происходит быстрое увеличение пула NADPH — субстрата NADPH-оксидазы. Эта реакция регулируется Ca^{2+} и связывающим его белком кальмодулином и катализируется NAD-киназой. Из NAD^+ образуется NADP⁺, который может затем превращаться в NADPH с помощью пентозофосфатного пути [7].

В реакциях образования АФК O_2^- возникает в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. O_2^- — эффективный ингибитор [4Fe, 4S]-групп различных белков. После протонирования O_2^- становится сильным одновалентным окислителем этих групп, которые, теряя стабильность, подвергаются затем разрушению [8]. Одноэлектронное восстановление O_2^- ведет к образованию H_2O_2 , а двухэлектронное — гидроксильного радикала (OH^*), способного окислить практически любое соединение в клетке и обладающее временем жизни 10^{-9} с.

Растения защищает от АФК супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая реакцию: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Образующийся H_2O_2 может быть утилизирован каталазой или пероксидазами. СОД подразделяют на четыре основные группы: Cu,Zn-СОД, Mn-СОД, Fe-СОД и Ni-СОД. Кроме того, имеются данные о Fe,Zn- и Co,Zn-

СОД [9]. У растений имеются СОД первых трёх групп, расположенные в различных клеточных компартментах: Fe-СОД — в хлоропластах, Mn-СОД — в митохондриях и пероксисомах, Cu,Zn-СОД — в хлоропластах, пероксисомах и цитоплазме, а также в ядре и апопласте [9, 10]. Нарушение действия этих ферментов ведёт к гибели клеток [11]. Активность Cu,Zn-СОД, как показано у бактерий, дрожжей и животных, подавляется агентами, хелирующими Cu^{2+} : N,N'-диэтилдитиокарбаматом (ДДК) [12–15] и триэтилтетраамином (триеном) [16–18]. Цианид, азид и H_2O_2 в миллимолярных концентрациях ингибируют СОД разных групп [9].

Энергетический метаболизм регулируется в зависимости от состояния и потребностей клеток. O_2 снижает потребление глюкозы и подавляет образование лактата из пирувата (эффект Пастера [19, 20]). В расчёте на 1 молекулу потреблённой глюкозы выход АТФ при гликолизе составляет 2 молекулы, а при окислительном фосфорилировании — до 36 молекул [21]. Несмотря на это, быстро растущие клетки предпочитают использовать гликолиз как источник АТФ при аэробной пролиферации — аэробный гликолиз [22], свойственный опухолевым клеткам, лимфоцитам, эндотелиальным клеткам, дрожжам. Благодаря высокой скорости аэробный гликолиз может дать АТФ даже больше, чем окислительное фосфорилирование [23]. Аэробный гликолиз обеспечивает превращение глюкозы в пируват и лактат при недостатке O_2 для поддержания ЦТК и окислительного фосфорилирования в функционально активных митохондриях (эффект Варбурга [24, 25]). Главная роль аэробного гликолиза, по-видимому, заключается в поддержании постоянного уровня его промежуточных продуктов для синтеза макромолекулярных соединений при делении клеток [22]: из рибозо-5-фосфата, синтезированного из глюкозо-6-фосфата или фруктозо-6-фосфата, образуется фосфорибозилпирофосфат, используемый в синтезе нуклеотидов; промежуточный продукт гликолиза, 3-фосфоглицериновый альдегид, является предшественником дигидроксиацетонфосфата, из которого синтезируются липиды (фосфолипиды и триацилглицеролы) — компоненты клеточных мембран; из продуктов гликолиза 3-фосфоглицерата образуется аминокислота серин (а из серина — глицин и цистеин), из пирувата — аланин. Окислительное фосфорилирование эффективнее в синтезе АТФ, тогда как гликолиз предпочтителен в синтезе биомассы, видимо, поэтому покоящиеся клетки главным образом используют митохондриальное окислительное фосфорилирование, а быстро пролиферирующие — гликолиз [26]. Следует от-

метить, что в быстро растущих опухолевых клетках, для которых характерен аэробный гликолиз, содержание АФК выше, чем в нормальных клетках той же ткани [27].

Глюкоза ускоряет гликолиз и подавляет окислительное фосфорилирование — это эффект Кребттри [28], характерный для дрожжей и некоторых опухолевых клеток и имеющий общие черты с эффектом Варбурга [29]. Цитозольный NADH, продуцируемый при гликолизе, снижает проницаемость наружной мембраны митохондрий из клубней картофеля для ADP и тем самым тормозит их дыхание, имитируя эффект Кребттри [30]. Данные об аэробном гликолизе у растений в литературе отсутствуют.

В настоящей работе ДДК и триен, ингибирующие СОД, испытаны на клетках эпидермиса листьев растений. В опытах использованы листья из проростков гороха разного возраста: «молодые», 6–11-суточные, быстро растущие с интенсивными обменными реакциями и «старые», 14–26-суточные, с замедленным ростом. Исследован эффект глюкозы в комбинации с ингибиторами СОД на гибель клеток и генерацию АФК в эпидермисе из молодых и старых листьев гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа) выращивали при периодическом освещении (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРиЗ, 250 Вт, с интенсивностью света ~ 100 мкЕ·м⁻²·с⁻¹. Использовали быстро растущие нераскрывшиеся листья с верхушки побегов молодых проростков, выращиваемых 6–11 суток, или медленно растущие листья, отделённые от середины побегов зрелых растений (14–26 суток), которые обозначены в работе как «молодые» или «старые» листья соответственно.

Гибель устьичных клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [3]. Плёнки эпидермиса отделяли от листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду и добавляли реагенты (см. подписи к рисункам). Инфильтрацию реагентов проводили под вакуумом, создаваемым с помощью вакуумного насоса в течение 1 мин. Плёнки эпидермиса инкубировали с реагентами в полистирольных планшетах. После инкубации их обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1) 5 мин, промывали этанолом 10 мин для удаления фиксатора, инкубировали 5 мин в воде и окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци

20 мин. Окрашенные плёнки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта подсчитывали долю клеток с разрушенными ядрами и лишённых ядер из 300–500 клеток в 2–3 плёнках эпидермиса.

Поглощение или светозависимое выделение O₂ высечками из листьев гороха (20 мг) измеряли с помощью закрытого платинового электрода в полярографической ячейке, содержащей 1,5 мл среды инкубации: 50 мМ Tricine-KOH, pH 7,8, 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl₂. Высечки листьев гороха освещали сфокусированным светом галогеновой лампы, 250 Вт, с интенсивностью света ~ 2000 мкЕ·м⁻²·с⁻¹. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания).

Для определения содержания глюкозы и лактата в листьях гороха гомогенизировали 200 мг нарезок листьев, к гомогенату добавляли 300 мкл бидистиллированной воды, центрифугировали 15 мин при 12 000 g, отбирали 300 мкл надосадочной жидкости и измеряли в ней глюкозу или лактат с помощью биохимического анализатора Random Access A-25 («BioSystems S.A.», Испания). Определение осуществлялось по глюкозооксидазной и лактатоксидазной реакциям с образованием H₂O₂, который затем в реакциях с 4-аминоантипирином и фенолом или N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином, катализируемых пероксидазой, образовывал окрашенные хинонимы с максимумами поглощения при 505 или 555 нм соответственно.

АФК определяли по образованию 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) из диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцина (DCFH-DA). Проникая в клетки, DCFH-DA дезацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H₂O₂ с участием пероксидаз, превращаясь в интенсивно флуоресцирующий DCF. Образованию DCF могут способствовать ионы металлов переменной валентности, например, Fe²⁺ и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [31, 32]. Образование АФК детектировали двумя способами. 1. Плёнку эпидермиса, закреплённую на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ Tricine-KOH, pH 7,8, 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl₂, добавляли 20 мкМ DCFH-DA. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor («BioRad», США), возбуждая светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм. 2. Плёнки эпидермиса окрашивали 20 мкМ DCFH-DA в течение 30 мин и исследовали под микроскопом

Axiovert 200M с конфокальной приставкой LSM 510Meta («Carl Zeiss», Германия). Флуоресценцию DCF возбуждали светом лазера 488 нм и регистрировали при 500–530 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДДК и триен, соединения, хелирующие Cu^{2+} и используемые в качестве ингибиторов СОД, вызывали разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха (рис. 1). Действие глюкозы зависело от возраста листьев. Глюкоза сама по себе не влияла на состояние ядер устьичных клеток, но усиливала разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД в эпидермисе из молодых листьев, и не оказывала влияния на ДДК- и триен-зависимое разрушение ядер в эпидермисе из старых листьев. 2-Дезоксиглюкоза, ингибитор гликолиза, снимала эффект глюкозы на клетки из молодых листьев, не оказывая влияния на разрушение ядер в клетках из старых листьев под действием ингибиторов СОД и глюкозы (рис. 1).

Было испытано действие других соединений, хелирующих ионы металлов, на разруше-

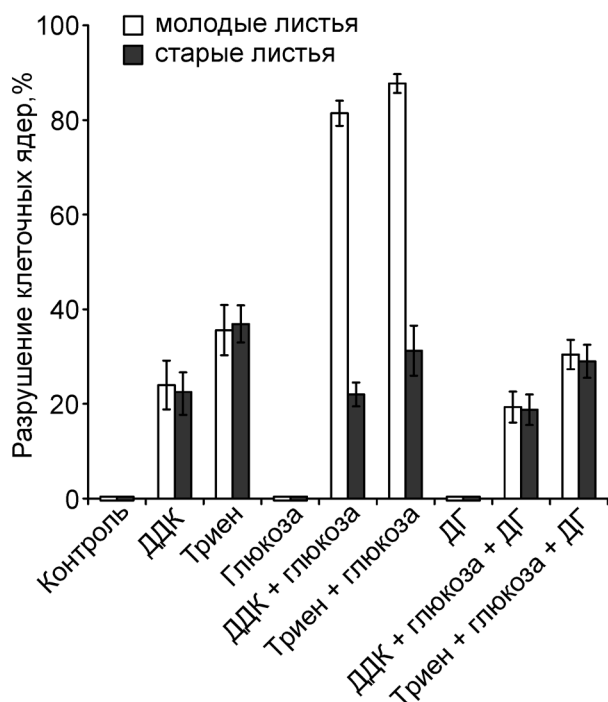


Рис. 1. Действие ДДК, триена, глюкозы и 2-дезоксиглюкозы (ДГ) на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 8- или из 14-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ триена, 10 мМ глюкозы и 10 мМ ДГ, вакуумировали 1 мин и инкубировали 23 ч в темноте

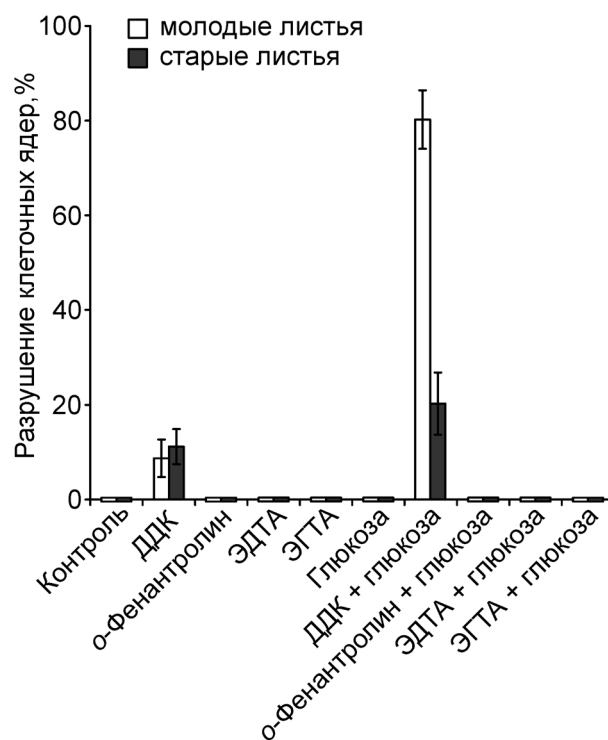


Рис. 2. Действие ДДК, *o*-фенантролина, ЭДТА, ЭГТА и глюкозы на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 8- или из 22-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ *o*-фенантролина, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ ЭГТА и 5 мМ глюкозы, вакуумировали 1 мин и инкубировали 22 ч в темноте

ние ядер устьичных клеток в эпидермисе из молодых или старых листьев гороха. *o*-Фенантролин, ЭДТА и ЭГТА, в отличие от ДДК, не вызывали разрушения ядер клеток сами по себе или в комбинации с глюкозой (рис. 2).

Оксиметрически и по содержанию лактата сравнивали реакции энергетического обмена (дыхание, фотосинтетическое выделение O_2 и гликолиз) в молодых и старых листьях. Скорости выделения O_2 на свету и темнового дыхания в высечках из молодых листьев гороха были в среднем в 2–3 раза выше, чем в высечках из старых листьев (рис. 3). Это согласуется с данными о возрастных изменениях фотосинтеза и дыхания в листьях растений [33, 34]. Добавка глюкозы не влияла на скорость дыхания. ДДК примерно в 1,5 раза снижал скорость поглощения O_2 в темноте молодыми листьями, но не влиял на дыхание старых листьев, а триен не действовал на молодые листья, но на 80% ускорял поглощение O_2 старыми листьями (рис. 3). Поскольку реакция, катализируемая СОД, происходит с выделением O_2 , ингибиторы СОД будут усиливать поглощение O_2 . Этот их эффект

проявляется в большей степени на старых листьях, что может свидетельствовать об увеличении в них скорости реакции, осуществляемой СОД, т.е. о повышенном содержании O_2^- и/или СОД в старых листьях. Так, в старых листьях рапса активность СОД была выше, чем в молодых, а концентрация O_2^- , напротив, уменьшалась с возрастом [35].

Концентрация глюкозы в молодых и старых листьях гороха поддерживалась на одном уровне, но содержание лактата в старых листьях было в 3–4 раза выше, чем в молодых (рис. 4). Это может быть обусловлено потреблением промежуточных продуктов гликолиза в молодых листьях для синтеза органических соединений, а также использованием пирувата в митохондриальном дыхании.

Пропилгаллат, антиоксидант, имитирующий действие СОД [36], подавлял разрушение ядер клеток в эпидермисе из молодых листьев гороха, вызванное ДДК и глюкозой, но не оказывал влияния на разрушение ядер устьичных клеток из старых листьев (рис. 5).

Глюкоза стимулировала образование АФК в плёнке эпидермиса из листьев гороха, которое



Рис. 3. Дыхание и фотосинтетическое выделение O_2 в высечках из молодых (а, б) или старых (в, г) листьев гороха: действие глюкозы, ДДК и триена. Молодые и старые листья из 10- или 21-суточных проростков соответственно. ВЛ – высечки листьев. Вк и Вык – включение и выключение света соответственно. Добавки: 20 мг ВЛ, 10 мМ глюкозы, 10 мМ ДДК и 10 мМ триена

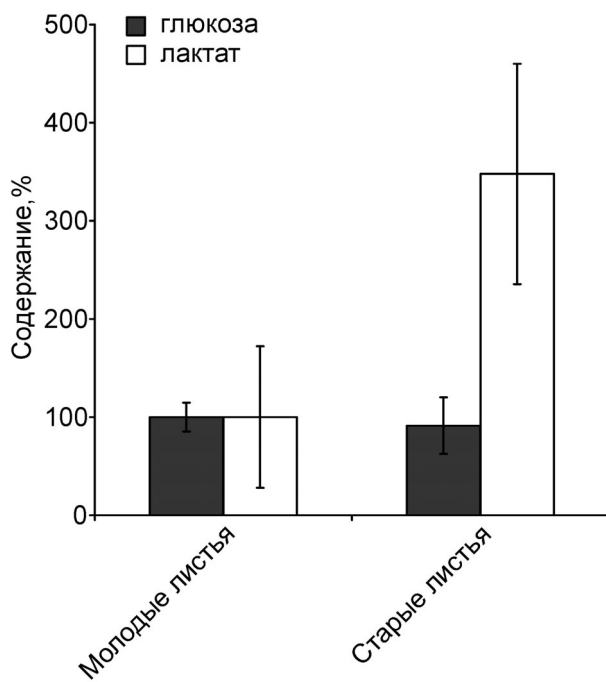


Рис. 4. Содержание глюкозы и лактата в молодых или старых листьях гороха. Молодые и старые листья из 10- или 17-суточных проростков соответственно. За 100% принято усреднённое содержание глюкозы или лактата в молодых листьях, которое соответствует 1,37 мг глюкозы или 10,2 мкг лактата на 1 г сырой массы листьев

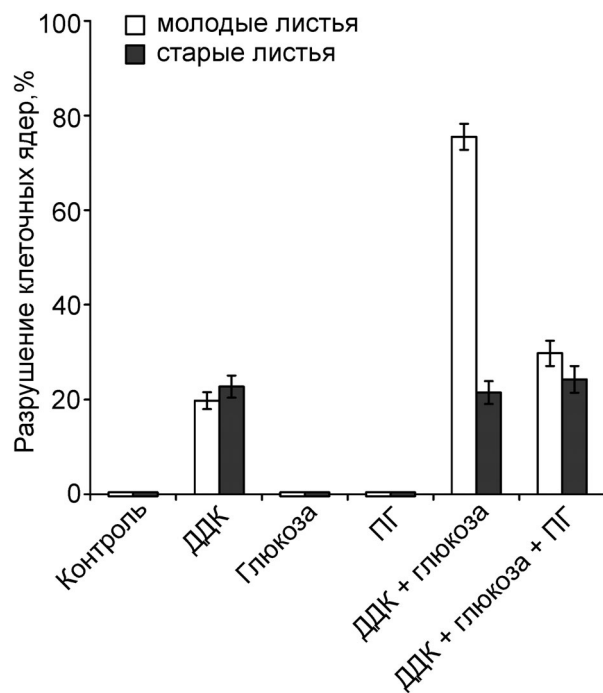


Рис. 5. Действие ДДК, глюкозы и пропилгаллата (ПГ) на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 11- или из 26-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ глюкозы и 0,1 мМ ПГ, вакуумировали 1 мин и инкубировали 23 ч в темноте

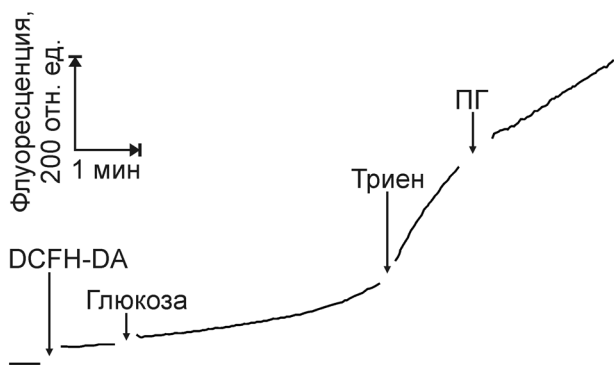


Рис. 6. Действие глюкозы, триена и пропилгаллата (ПГ) на образование АФК в плёнке эпидермиса из листьев гороха, регистрируемое по флуоресценции DCF. Использовали молодые листья из 9-суточных проростков. Флуоресценцию измеряли с помощью флуориметра. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 10 мМ глюкозы, 10 мМ триена и 0,5 мМ ПГ

регистрировали по флуоресценции DCF (рис. 6). Триен, ингибирующий СОД, увеличивал выход флуоресценции DCF. Антиоксидант, пропилгаллат, снижал рост флуоресценции DCF, вызванный глюкозой и триеном.

Обработка клеток протонофорными разобщителями значительно усиливает гликолиз [37]. Протонофорный разобщитель *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ) снижал выход флуоресценции DCF в устьичных клетках эпидермиса из листьев гороха (рис. 7, а). Обработка плёнок эпидермиса из молодых или старых листьев гороха ХКФ с последующей отмывкой от него усиливала разрушение ядер устьичных клеток, вызванное ингибиторами СОД ДДК и триеном (рис. 7, б и в). При обработке плёнок эпидермиса ХКФ в течение 2 ч стимуляция разрушения ядер клеток, вызванного ДДК (без глюкозы), проявлялась лишь в старых листьях.

Данные о разрушении ядер клеток при действии ингибиторов СОД (рис. 1), отсутствии эффекта других комплексонов на ядра клеток (рис. 2) и подавлении разрушения ядер пропилгаллатом, имитирующим СОД (рис. 5), подтверждают, что ДДК- и триен-зависимая гибель клеток обусловлена подавлением активности СОД. Глюкоза усиливает зависимое от ингибиторов СОД разрушение ядер клеток. Действие глюкозы проявляется только на клетках из молодых листьев и предотвращается ингибитором гликолиза 2-дезоксиглюкозой (рис. 1) — это свидетельствует о том, что эффект глюкозы опосредован гликолизом. В этом процессе задействованы АФК, образование которых стимулируется глюкозой и триеном (рис. 6).

Полученные данные соответствуют результатам исследования роли СОД в аэробном гли-

колизе у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [38]. В этой работе высокое содержание глюкозы в питательной среде дрожжей подавляло митохондриальное дыхание (эффект Кребтри [28]), но усиливало образование O_2^- , что свидетельствует о зависимом от глюкозы образовании АФК. Источником O_2^- мог быть подобный NADPH-оксидазе белок YNO1. С использованием мутантов дрожжей с делецией в генах, кодирующих СОД, установлено, что O_2^- , генерируемый при аэробном росте дрожжей на глюкозе, при участии Cu,Zn-СОД превращается в H_2O_2 . Действуя локально H_2O_2 стабилизирует казеинкиназу YCK1 плазматической мембраны, регулирующую подавление дыхания и рецепцию глюкозы и аминокислот [38].

Ингибирование СОД приводит к накоплению в клетках АФК (рис. 6) и разрушению клеточных ядер, а глюкоза усиливает разрушение ядер в устьичных клетках в эпидермисе из молодых листьев гороха (рис. 1). Представляет интерес, как добавка глюкозы может стимулировать образование АФК. Глюкоза эффективно действует на клетки из молодых листьев (рис. 1), которые активнее пролиферируют, следовательно, гликолиз играет более значительную роль в их энергетическом и строительном обмене.

Зависимая от глюкозы генерация АФК, скорее всего, не связана с митохондриями. Об этом свидетельствуют результаты действия протонофорного разобщителя. В митохондриях протонофорные разобщители подавляют окислительное фосфорилирование и образование АФК [39]. Действительно, ХКФ снижал выход флуоресценции DCF в устьичных клетках гороха (рис. 7, а), но разрушение ядер, напротив, усиливалось ХКФ (рис. 7, б и в). По-видимому, в клетках из старых листьев после обработки разобщителем происходит активация гликолиза [37] и возрастает разрушение ядер клеток — как в клетках из молодых листьев при добавке глюкозы. В молодых листьях ХКФ был менее эффективен, чем в старых (рис. 7, б и в).

Не исключено, что стимуляция разрушения ядер протонофорным разобщителем связана не с АФК, а с деэнергизацией клеток: ХКФ усиливал разрушение ядер устьичных клеток гороха, вызванное цианидом; ХКФ и 2-дезоксиглюкоза сами по себе вызывали гибель устьичных клеток при инкубации, длящейся двое суток и более [40].

Предположительно, эффект глюкозы может быть опосредован гликолизом или пентозофосфатным путём, в которых происходит восстановление NAD^+ или $NADP^+$ соответственно. С одной стороны, NADH может играть роль антиоксиданта: в митохондриях клеток он является ос-

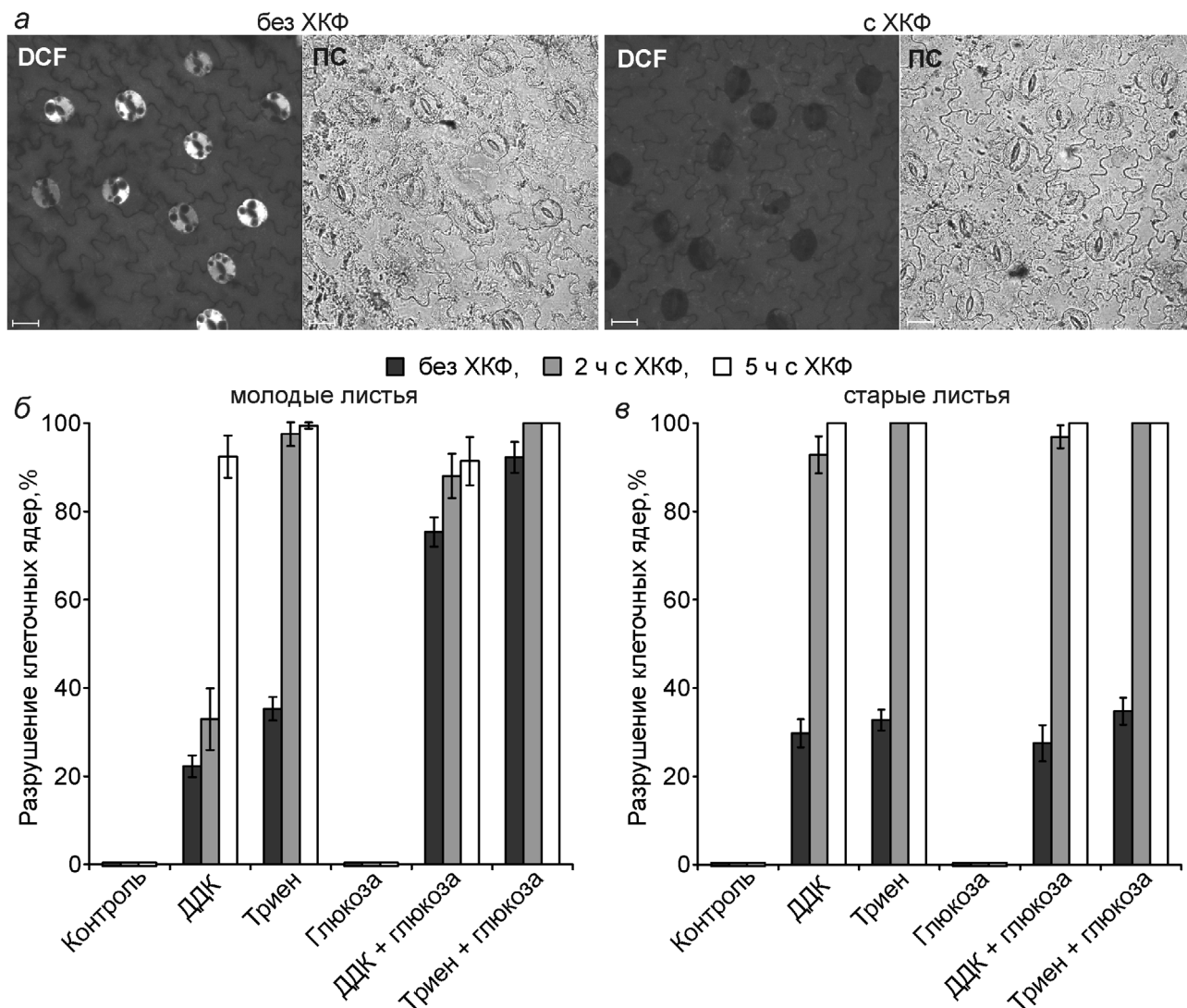


Рис. 7. Действие *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидраза (ХКФ) на образование АФК в устьичных клетках, регистрируемое по флуоресценции DCF (*а*) и действие ДДК, триена и глюкозы на состояние ядер устьичных клеток после обработки ХКФ в плёнках эпидермиса из молодых (*б*) и старых (*в*) листьев гороха. Молодые листья из 9-суточных проростков (*б*), старые листья из 16-суточных проростков (*а*) или из 21-суточных проростков (*в*). *а* – Плёнки эпидермиса 30 мин инкубировали с 20 мкМ DCFH-DA без ХКФ или с 1 мкМ ХКФ. Изображения получали методом конфокальной микроскопии. Обозначения: DCF – флуоресценция DCF, ПС – изображение в проходящем свете. Масштабный отрезок – 20 мкм. *б*, *в* – К плёнкам эпидермиса, необработанным ХКФ или преинкубированным 2 или 5 ч в темноте с 1 мкМ ХКФ, а затем отмытым от ХКФ полосканием в 100 мл дистиллированной воды, добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ триена и 10 мМ глюкозы, вакуумировали 1 мин и инкубировали 22 (*б*) или 21 (*в*) ч в темноте

новой мишенью для синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) [41]. С другой стороны, NADH как донор электронов для пероксидазы способствует образованию O_2^- [6]. Фенольные соединения ускоряют окисление NADH пероксидазой [42]. Так, NADH вызывал образование O_2^- в суспензии митохондрий из корней гороха, которое стимулировалось фенольными соединениями и было обусловлено пероксидазой. NADH, добавленный в среду инкубации, вызывал разрушение ядер устьичных клеток гороха, а фенольные соединения усиливали его [43]. NADPH может быть

использован в качестве субстрата NADPH-оксидазы плазматической мембраны, генерирующей внеклеточный O_2^- . Судя по всему, NADPH-оксидаза плазматической мембраны задействована в гибели клеток растений: её ингибиторы хинакрин и дифенилениодоний подавляли разрушение ядер устьичных клеток гороха, вызванное CN^- [44]. АФК в форме O_2^- , тем более образованного снаружи клеток, не будут детектироваться DCF, что не противоречит данным рис. 7, *а*.

Полученные результаты описывают действие ингибиторов СОД и глюкозы на гибель

клеток и генерацию АФК в эпидермисе из молодых и старых листьев гороха. В совокупности данные могут свидетельствовать об образовании АФК, зависящем от гликолиза.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам Центра коллективного пользования МГУ

имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность использовать оборудование, приобретенное за счет средств Программы развития МГУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Shestak, A. A., Nesov, A. V., and Vasil'ev, L. A. (2008) Reactive oxygen species in programmed death of pea guard cells, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1076-1084, doi: 10.1134/s0006297908100039.
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., and Hasanuzzaman, M. (2021) Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms, *Antioxidants*, **10**, 277, doi: 10.3390/antiox10020277.
- Samuilov, V. D., Lagunova, E. M., Kiselevsky, D. B., Dzyubinskaya, E. V., Makarova, Y. V., and Gusev, M. V. (2003) Participation of chloroplasts in plant apoptosis, *Biosci. Rep.*, **23**, 103-117, doi: 10.1023/a:1025576307912.
- Vasil'ev, L. A., Dzyubinskaya, E. V., Kiselevsky, D. B., Shestak, A. A., and Samuilov, V. D. (2011) Programmed cell death in plants: protective effect of mitochondrial-targeted quinones, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1120-1130, doi: 10.1134/S0006297911100051.
- Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., and Oleskin, A. V. (2019) Mitochondria-targeted quinones suppress the generation of reactive oxygen species, programmed cell death and senescence in plants, *Mitochondrion*, **46**, 164-171, doi: 10.1016/j.mito.2018.04.008.
- Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
- Dell'Aglio, E., Giustini, C., Kraut, A., Couté, Y., Costa, A., et al. (2019) Identification of the Arabidopsis calmodulin-dependent NAD⁺ kinase that sustains the elicitor-induced oxidative burst, *Plant Physiol.*, **181**, 1449-1458, doi: 10.1104/pp.19.00912.
- Imlay, J. A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 443-454, doi: 10.1038/nrmicro3032.
- Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., and Shen, F. F. (2016) Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 465-480, doi: 10.1134/S0006297916050047.
- Alscher, R. G., Erturk, N., and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.*, **53**, 1331-1341.
- Tsunoda, S., Kibe, N., Kurahashi, T., and Fujii, J. (2013) Differential responses of SOD1-deficient mouse embryonic fibroblasts to oxygen concentrations, *Arch. Biochem. Biophys.*, **537**, 5-11, doi: 10.1016/j.abb.2013.06.008.
- Heikkilä, R. E., Cabbat, F. S., and Cohen, G. (1976) *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2182-2185.
- Cocco, D., Calabrese, L., Rigo, A., Argese, E., and Rotilio, G. (1981) Re-examination of the reaction of diethyldithiocarbamate with the copper of superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8983-8986.
- Benov, L., and Fridovich, I. (1996) Functional significance of the Cu,ZnSOD in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 249-253, doi: 10.1006/abbi.1996.0117.
- Lushchak, V., Semchysyn, H., Lushchak, O., and Mandryk, S. (2005) Diethyldithiocarbamate inhibits *in vivo* Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1739-1744, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.147.
- Kelner, M. J., Bagnell, R., Hale, B., and Alexander, N. M. (1989) Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation, *Free Radic. Biol. Med.*, **6**, 355-360, doi: 10.1016/0891-5849(89)90079-8.
- An, J., and Hsie, A. W. (1992) Effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase on bleomycin mutagenesis in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, **270**, 167-175, doi: 10.1016/0027-5107(92)90127-n.
- An, J., and Hsie, A. W. (1993) Polymerase chain reaction-based deletion screening of bleomycin induced 6-thioguanine-resistant mutants in Chinese hamster ovary cells: the effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase, *Mutat. Res.*, **289**, 215-222, doi: 10.1016/0027-5107(93)90072-n.
- Pasteur, L. (1861) Expériences et vues nouvelles sur la nature de fermentations, *C. R. Acad. Sci.*, **52**, 1260-1264.
- Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology, *Mol. Cell. Biochem.*, **5**, 17-23, doi: 10.1007/BF01874168.
- Ленинджер А. (1985) *Основы биохимии*, Мир, Москва.
- Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-464, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways, *Science*, **292**, 504-507, doi: 10.1126/science.1058079.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924) Über den stoffwechsel der carcinomzelle, *Biochem. Z.*, **152**, 309-344.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells, *Science*, **123**, 309-314, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- Sokolov, S. S., Balakireva, A. V., Markova, O. V., and Severin, F. F. (2015) Negative feedback of glycolysis and oxidative phosphorylation: mechanisms of and reasons for it, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 559-564, doi: 10.1134/S0006297915050065.
- Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W., and Spitz, D. R. (2009) Increased levels of superoxide and

- H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation, *Biochem. J.*, **418**, 29-37, doi: 10.1042/BJ20081258.
28. Crabtree, H. G. (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem. J.*, **23**, 536-545, doi: 10.1042/bj0230536.
 29. Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., and Devin, A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 568-576, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010.
 30. Lee, A. C., Zizi, M., and Colombini, M. (1994) Beta-NADH decreases the permeability of the mitochondrial outer membrane to ADP by a factor of 6, *J. Biol. Chem.*, **269**, 30974-30980.
 31. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227-231, doi: 10.1021/tx00026a012.
 32. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennesson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
 33. Sesay, A., Stewart, C. R., and Shibles, R. M. (1986) Effects of KCN and salicylhydroxamic acid on respiration of soybean leaves at different ages, *Plant Physiol.*, **82**, 443-447, doi: 10.1104/pp.82.2.443.
 34. Moore, B. D., and Edwards, G. E. (1988) The influence of leaf age on C₄ photosynthesis and the accumulation of inorganic carbon in *Flaveria trinervia*, a C₄ Dicot, *Plant Physiol.*, **88**, 125-130, doi: 10.1104/pp.88.1.125.
 35. Hajiboland, R., Rahmat, S., Zeinalzadeh, N., Farsad-Akhtar, N., and Hosseinpour-Feizi, M.-A. (2019) Senescence is delayed by selenium in oilseed rape plants, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **55**, 96-106, doi: 10.1016/j.jtemb.2019.06.005.
 36. Reddan, J. R., Giblin, F. J., Sevilla, M., Padgaonkar, V., Dziedzic, D. C., et al. (2003) Propyl gallate is a superoxide dismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult, *Exp. Eye Res.*, **76**, 49-59, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00256-7.
 37. Sugiyama, Y., Shudo, T., Hosokawa, S., Watanabe, A., Nakano, M., and Kakizuka, A. (2019) Emodin, as a mitochondrial uncoupler, induces strong decreases in adenosine triphosphate (ATP) levels and proliferation of B16F10 cells, owing to their poor glycolytic reserve, *Genes Cells*, **24**, 569-584, doi: 10.1111/gtc.12712.
 38. Reddi, A. R., and Culotta, V. C. (2013) SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration, *Cell*, **152**, 224-235, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.046.
 39. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
 40. Dzyubinskaya, E. V., Kiselevsky, D. B., Lobysheva, N. V., Shestak, A. A., and Samuilov, V. D. (2006) Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1120-1127, doi: 10.1134/s0006297906100105.
 41. Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M., and de Groot, H. (2003) NAD(P)H, a primary target of ¹O₂ in mitochondria of intact cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 3298-3307, doi: 10.1074/jbc.M204230200.
 42. Brooks, J. L. (1983) Stimulation of peroxidase reactions by hydroxamates, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **116**, 916-921.
 43. Самуилов В. Д., Киселевский Д. Б. (2016) Салицилгидроксамат усиливает НАДН-оксидазную активность пероксидазы в суспензиях митохондрий и хлоропластов гороха, *Вестник Московского университета. Серия 16, Биология*, **1**, 23-28, doi: 10.3103/S0096392516010089.
 44. Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Sinityn, S. V., Shestak, A. A., Lagunova, E. M., and Nesov, A. V. (2006) H₂O₂ intensifies CN⁻-induced apoptosis in pea leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 384-394, doi: 10.1134/s0006297906040067.

EFFECTS OF SUPEROXIDE DISMUTASE INHIBITORS AND GLUCOSE ON CELL DEATH AND GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PEA LEAVES

V. D. Samuilov^{1*}, D. B. Kiselevsky^{1*}, E. V. Dzyubinskaya¹, and O. Yu. Frolova²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia;
E-mail: vdsamuilov@mail.ru; dkiselevs@mail.ru

² Lomonosov Moscow State University, Institute of Mitoengineering, 119234 Moscow, Russia

The effect of diethyldithiocarbamate (DDC) and triethylenetetramine (triene), superoxide dismutase (SOD) inhibitors, and their combination with glucose on cells of the epidermis from pea leaves of different ages (fast growing young leaves and old leaves with slow growth) was investigated. DDC and triene caused the death of guard cells, which was determined from the destruction of their nuclei. Glucose did not affect the destruction of nuclei that was induced by SOD inhibitors in cells from old leaves, but increased it in cells from young leaves. 2-Deoxyglucose, a glycolysis inhibitor, and propyl gallate, an antioxidant that mimics SOD, suppressed the destruction of nuclei in cells of the epidermis from young, but not from old leaves, which was caused by SOD inhibitors with glucose. Glucose and triene stimulated, and propyl gallate reduced the generation of reactive oxygen species (ROS) in the pea epidermis, that was determined from the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), a protonophoric uncoupler of oxidative and photosynthetic phosphorylation, suppressed DCF fluorescence in guard cells. Treatment of cells with CCCP followed by removing it by washing increased the destruction of the nuclei that was caused by SOD inhibitors and glucose. In young leaves, CCCP was less effective than in old ones. The results obtained demonstrate the effects of SOD inhibitors and glucose on cell death and generation of ROS and apparently testify to glycolysis-dependent ROS production.

Keywords: glucose, superoxide dismutase, reactive oxygen species, programmed cell death, guard cells, pea