

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.175.82

Действие нейромедиаторов на программируемую клеточную смерть и образование активных форм кислорода в эпидермисе листьев гороха

Д.Б. Киселевский^{1,*} , А.В. Олескин² , В.Д. Самуилов¹

¹Кафедра иммунологии и ²кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: dkiselevs@mail.ru

Нейромедиаторы обнаружены не только у животных, но и у других живых организмов, включая растения. Однако данные о функциях этих соединений в растительном мире далеко не полны, в частности, не исследован вопрос об их влиянии на гибель растительных клеток. В настоящей работе испытано действие нейромедиаторов на программируемую гибель клеток и образование активных форм кислорода (АФК) у растений. Программируемую гибель клеток регистрировали по разрушению их ядер, а АФК определяли с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Использовали дофамин, норадреналин, серотонин, гистамин, ацетилхолин и его синтетический аналог ацетилтиохолин. Катехоламины дофамин и норадреналин в концентрациях 0,01–1 мМ подавляли разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха, вызванное KCN. Серотонин и ацетилхолин в концентрациях 1–3 мМ, напротив, усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер. Гистамин и ацетилтиохолин не оказывали влияния на KCN-зависимое разрушение ядер в концентрациях 0,01–3 мМ. Ацетилтиохолин в концентрации 3 мМ, в отличие от природных нейромедиаторов, вызывал разрушение ядер устьичных клеток в отсутствие KCN. Дофамин, норадреналин и серотонин подавляли образование АФК в эпидермисе листьев гороха, вызванное менадионом. Гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохолин не обладали подобным эффектом. Результаты показывают, что у растений дофамин, норадреналин и серотонин обладают свойствами антиоксидантов. Кроме того, дофамин и норадреналин могут защищать клетки от гибели.

Ключевые слова: нейромедиаторы, биогенные амины, программируемая гибель клеток, активные формы кислорода, горох

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-1

Введение

Нейромедиаторы — это низкомолекулярные соединения различной химической природы; важными их представителями являются биогенные амины (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин, гистамин и др.) и ацетилхолин [1]. Наиболее известная их функция у животных — участие в передаче возбуждения от клетки к клетке. Нейромедиаторы выполняют и иные функции. Так, гистамин играет важную роль в иммунорегуляции и аллергии, а также участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, кроветворения, эмбрионального развития и регенерации [2].

Эти соединения имеются не только у животных, но и у других организмов, включая растения.

Содержание нейромедиаторов в растениях зависит от вида и тканевой локализации, но в целом оно сравнимо с их концентрацией у животных [1].

Функции нейромедиаторов у растений не связаны с передачей нервных импульсов, поэтому применительно к растениям корректнее обозначить их термином «биомедиаторы» [1]. Эти соединения участвуют в формировании органов, цветении, транспорте ионов, фотосинтезе, циркадных ритмах, созревании плодов, фотоморфогенезе (зависимом от света процессе развития), адаптации к изменениям в окружающей среде. Такие биогенные амины, как катехоламины, были обнаружены у 28 видов из 18 тестируемых семейств растений [3]. Особо следует отметить, что повышенное количество дофамина

(1–4 мг/г свежей массы) содержится в цветах и плодах, например, соцветиях *Agaseae* и мякоти плодов бананов [4].

Биогенные амины, в частности катехоламины, выступают как факторы ответа на стресс. При повреждении листьев картофеля в них существенно возрастали концентрации дофамина, норадреналина и адреналина. Уровень дофамина повышался в тканях поврежденного кактуса *Portulacca callus* [4].

Важными регуляторами развития растений на всех этапах, от прорастания семян до цветения, являются также серотонин и его производное мелатонин [5]. Так, серотонин ускорял рост побегов у *Hippeastrum hybridum* (у которого он также способствовал прорастанию семян) и *Mimosa pudica*. У растений риса серотонин задерживал процессы старения. Серотонин играл регуляторную роль в процессах формирования кончиков корней растений. Серотонин и мелатонин взаимодействуют в тканях растений с такими важными регуляторными соединениями, как окись азота, салициловая и жасмоновая кислоты [6].

Ацетилхолин синтезируется, по крайней мере, 65 видами цветковых растений, относящихся к 33 различным семействам. Это соединение в высокой концентрации содержится в жгучих волосках крапивы [3]. При экзогенной обработке он стимулирует рост цветковых растений (томатов, пшеницы, коровьего гороха, редьки посевной, листового салата бамбукового), способствует их цветению, ускоряет движение устьиц, усиливает действие фитохромной системы, снижает образование газообразного фитогормона этилена, препятствует сворачиванию листьев. В то же время добавление к среде культивирования ацетилхолина подавляло рост корневых волосков у резушки Таля [6].

Несмотря на изложенные выше данные, в литературе отсутствуют сведения о том, какое влияние биомедиаторы оказывают на гибель клеток растений. Чтобы заполнить этот пробел, проведено настоящее исследование.

Выделяют два типа гибели животных клеток: непрограммируемая (некроз) и регулируемая, или программируемая, клеточная смерть (ПКС), которая включает различные формы: апоптоз, аутофагию, пироптоз, некроптоз, ферроптоз, нетоз и другие [7]. Растениям присущи особые формы ПКС, обладающие чертами апоптоза, некроптоза и пироптоза [8]. ПКС у растений происходит в онтогенезе в процессе развития репродуктивных органов, формирования особых тканей (проводящих сосудов, аэренхимы), формирования и опадения листьев, а также в результате иммунной реакции растения в ответ на внедрение патогена — гиперчувствительного ответа [9, 10]. Гибель клеток может регулироваться различными низкомолекулярными соединениями. Важную

роль в реализации ПКС у растений играют энергообеспечение и активные формы кислорода (АФК) [11], поэтому, например, антиоксиданты и агенты или условия, действующие на энергетический метаболизм, оказывали влияние на гибель клеток [12].

В настоящей работе использовали биогенные амины дофамин и норадреналин (катехоламины), серотонин, гистамин, а также ацетилхолин и его синтетический аналог ацетилтиохолин (рис. 1). Целью настоящей работы стало испытание действия этих биомедиаторов на ПКС и образование АФК у растений.

Материалы и методы

Объект исследования. Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 13–24-суточных проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Альфа. Это монослой из клеток двух типов: замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) и основные клетки эпидермиса (эпидермальные клетки). В отличие от устьичных клеток, эпидермальные клетки не фотосинтезируют, так как не содержат хлоропластов. Горох выращивали при 18–26°C в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ Reflux (Рефлекс-С, Россия), 250 Вт, с интенсивностью $\sim 100 \text{ мкЕ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp (Hansatech, Великобритания). Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

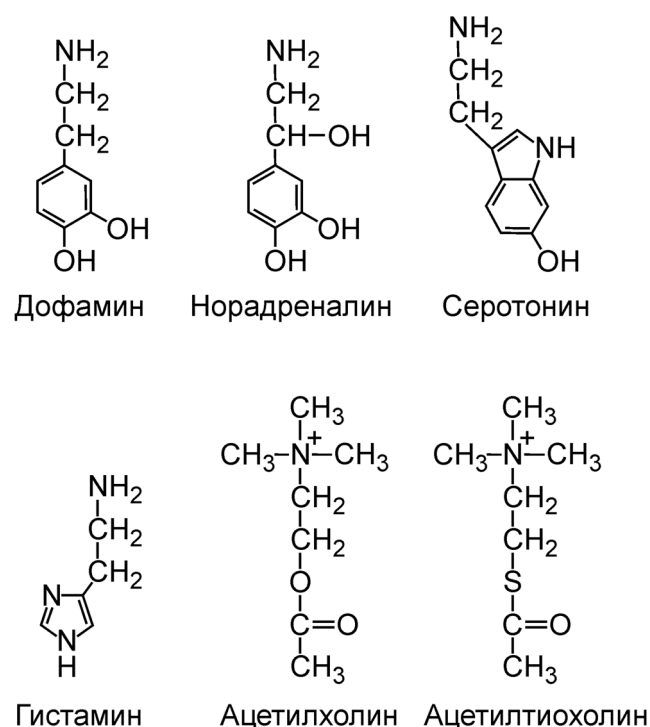


Рис. 1. Структура биомедиаторов, использованных в работе.

Гибель клеток. ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [12]. Пленки эпидермиса помещали в ячейки 6- или 12-луночных культуральных полистирольных планшетов (Greiner Bio-One, Австрия) с 2 мл бидистиллированной воды, добавляли реагенты (их состав и концентрация отмечены на рисунках или в подписях к ним) и инкубировали 22–24 ч. Контроль — без добавок реагентов. Условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

После инкубации эпидермис обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 10 мин этанолом и 5 мин водой для удаления фиксатора, затем окрашивали 40 мин гематоксилином Карацци. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Германия). В каждом варианте опыта определяли долю устьичных клеток с разрушенными ядрами (лишенных ядер).

Образование активных форм кислорода. АФК в клетках определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). DCFH-DA проникает в клетки, дезацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H_2O_2 с участием пероксидаз, превращаясь во флуоресцирующий DCF [13]. Его окисляют также гидроксильный радикал ($OH^\bullet$) и другие свободнорадикальные соединения, но не супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) [14]. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром *c*, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [15].

Менадион (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K_3) применяли в качестве агента, вызывающего продукцию АФК в клетках. Он восстанавливается различными ферментами, осуществляющими окислительно-восстановительные реакции, в том числе компонентами дыхательной и фотосинтетической электронтранспортных цепей, и окисляется кислородом с образованием $O_2^{\bullet-}$, который затем в реакции дисмутации продуцирует H_2O_2 [16–18].

В спектрофотометрическую кювету из полистирола (объемом 4 мл) вносили 2 мл среды инкубации: буфер 50 мМ Трицин–KOH (pH 7,8) с 0,4 М сахарозы, 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$. На полистирольную пластинку наносили силиконовый гель, с помощью которого приклеивали к пластинке пленку эпидермиса. Пластинку с эпидермисом помещали в кювету со средой инкубации вертикально так, чтобы угол между плоскостью пластинки и стенками кюветы составлял 45° . В среду инкубации последовательно добавляли DCFH-DA, менадион и другие реагенты. Флуоресценцию DCF возбуждали светом 485–495 нм

и регистрировали при 515–525 нм с помощью флуориметра VersaFluor (Bio-Rad, США) и компьютерной программы ФлуоСпектр 1.2 (МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия).

Статистическая обработка данных. В опытах с гибелью клеток (микроскопия) в каждом варианте опыта исследовали 300–750 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. На диаграммах отмечены средние арифметические значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы. Для проверки гипотезы о значимых отличиях средних значений полученных выборок (контроль или вариант с KCN в сравнении с одним из вариантов опыта) применяли *t*-критерий Стьюдента при уровне статистической значимости (*p*) равном 0,01. Эксперименты с измерением АФК повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов.

Результаты и обсуждение

Испытано действие биомедиаторов, функционирующих в качестве нейромедиаторов в нервной системе животных, на программируемую гибель устьичных клеток гороха, которую определяли по разрушению клеточных ядер. В качестве индуктора гибели клеток использовали KCN [12]. В клетках растений KCN ингибирует цитохром *c*-оксидазу в митохондриях, рибулозобисфосфаткарбоксилазу в хлоропластах [19] и ферменты, утилизирующие АФК: каталазу, пероксидазы и Cu, Zn-супероксиддисмутазу [20]. KCN вызывает ПКС — об этом свидетельствует ряд признаков: разрушение клеточных ядер с образованием их фрагментов, конденсация ядерного хроматина, межнуклеосомная фрагментация ДНК, а также чувствительность к антиоксидантам, к ингибиторам синтеза белка и к воздействиям, влияющим на энергетический метаболизм [12, 21, 22].

Обработка пленок эпидермиса KCN при освещении в течение суток вызывала разрушение ядер у 60–80% устьичных клеток (рис. 2). В темноте KCN разрушал ядра около 40% клеток (рис. 2, Г). Дофамин и норадреналин в концентрациях 0,01–1 мМ подавляли KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток на свету (рис. 2, А). С увеличением их концентрации до 3 мМ защитное действие прекращалось. Серотонин и ацетилхолин в концентрации 1–3 мМ, напротив, усиливали разрушение ядер, вызванное KCN на свету (рис. 2, Б). Гистамин и ацетилтиохолин не оказывали влияния на KCN-зависимое разрушение ядер в испытанном диапазоне концентраций (рис. 2, В). При инкубации в темноте биомедиаторы действовали сходным образом — дофамин и норадреналин подавляли разрушение ядер, вызванное KCN, а другие испытанные соединения не вызывали подобного эффекта (рис. 2, Г).

Могут ли биомедиаторы вступать в химическую реакцию с цианидом в наших эксперимен-

тах, влияя тем самым на их результаты? По-видимому, нет. Синильная кислота формирует фенольные соединения в реакции Гаттермана, однако для этого требуются HCl и хлориды некоторых металлов в качестве катализаторов. Полученные данные (рис. 2) показывают, что добавка биомедиаторов в концентрации 3 мМ, близкой к концентрации KCN (2,5 мМ), не предотвращала разрушения ядер, чего можно ожидать, если

бы KCN был израсходован в результате его химического взаимодействия с биомедиаторами. Кроме того, эффект цианида на фоне эквимоллярных концентраций адреналина, норадреналина и серотонина был ранее продемонстрирован в опытах на пупочных венах и артериях человека [23].

Среди испытанных биомедиаторов только ацетилтиохсин вызывал разрушение ядер сам по

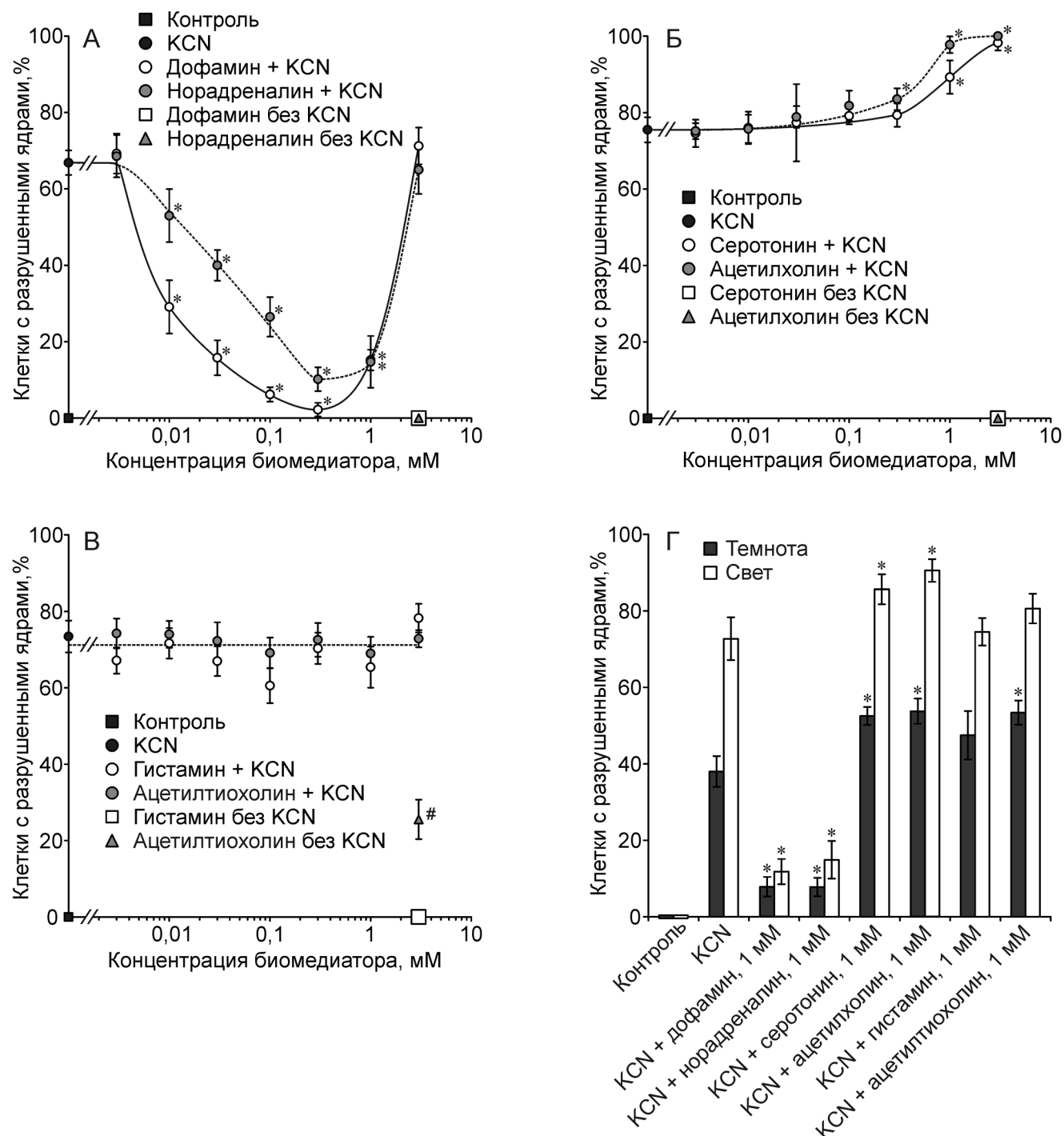


Рис. 2. Действие биомедиаторов на KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. К пленкам эпидермиса добавляли биомедиаторы, KCN (2,5 мМ) и инкубировали на свету (А–Г) или в темноте (Г). Отмечены значения, имеющие достоверные отличия ($p < 0,01$): контроль (без добавок) сравнивали с вариантами опыта «биомедиатор без KCN» (#); вариант с KCN (без биомедиаторов) сопоставляли с вариантами «биомедиатор + KCN» (*).

себе, без добавления KCN (рис 2, В), в отличие от его природного аналога ацетилхолина. Вероятно, гибель клеток растений могла быть обусловлена тиохолином — продуктом гидролиза ацетилтиохолина холинэстеразами. Холинэстеразная активность присуща растениям, особенно представителям семейства бобовых [1], включающего горох. Тиохоллин относится к тиолам, которые, как известно, индуцируют апоптоз в клетках млекопитающих [24]. Ацетилтиохоллин в комбинации с KCN не усиливал разрушение ядер (рис. 2, В), что может объясняться ингибиторным действием цианида на активность холинэстераз.

Исследовано также действие биомедиаторов на образование АФК в пленках эпидермиса из листьев гороха, которое регистрировали по флуоресценции DCF после добавки в среду инкубации DCFH-DA (рис. 3). Менадион стимулировал генерацию АФК — увеличивал в 3,5 раза скорость образования флуоресцирующего DCF (рис. 3, А). Эффект менадиона снижался добавкой антиоксиданта нитросинего тетразолия, реагирующего с супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$) с образованием формазана [25].

Дофамин, норадреналин и серотонин подавляли образование АФК в пленке эпидермиса (рис. 3, Б–Г). Добавка дофамина, норадреналина или серотонина (в концентрации 0,1 мМ) снижала скорость образования DCF на 28, 29 и 20% соответственно, в сравнении с его генерацией после добавки DCFH-DA и менадиона (без биомедиаторов). При концентрации дофамина, норадреналина или серотонина в среде инкубации, равной 1 мМ, скорость образования DCF уменьшалась более чем вдвое: на 65, 61 и 56% соответственно.

Гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохоллин не обладали подобным действием (рис. 3, Д–Ж). Напротив, гистамин в концентрации 1 мМ увеличивал скорость образования DCF в эпидермисе на 37%, ацетилхолин — на 25%, ацетилтиохоллин — на 10%.

Нитросиний тетразолий в 1,7–2,5 раза уменьшал скорость образования АФК на фоне действия всех испытанных биомедиаторов. Добавка KCN, используемого здесь в качестве ингибитора пероксидаз, прекращала зависимое от пероксидазной активности образование DCF (рис. 3, Б–Ж).

Антиоксидантное действие продемонстрировали фенольные биомедиаторы с одной или двумя гидроксильными группами, связанными с ароматическим кольцом в молекуле (рис. 1). Из них дофамин и норадреналин с двумя ОН-группами, но не серотонин, защищали клетки растений от гибели, вызванной KCN (рис. 2, А, Б). В мировой литературе есть множество работ, свидетельствующих об антиоксидантных свойствах различных фенольных соединений [26–28].

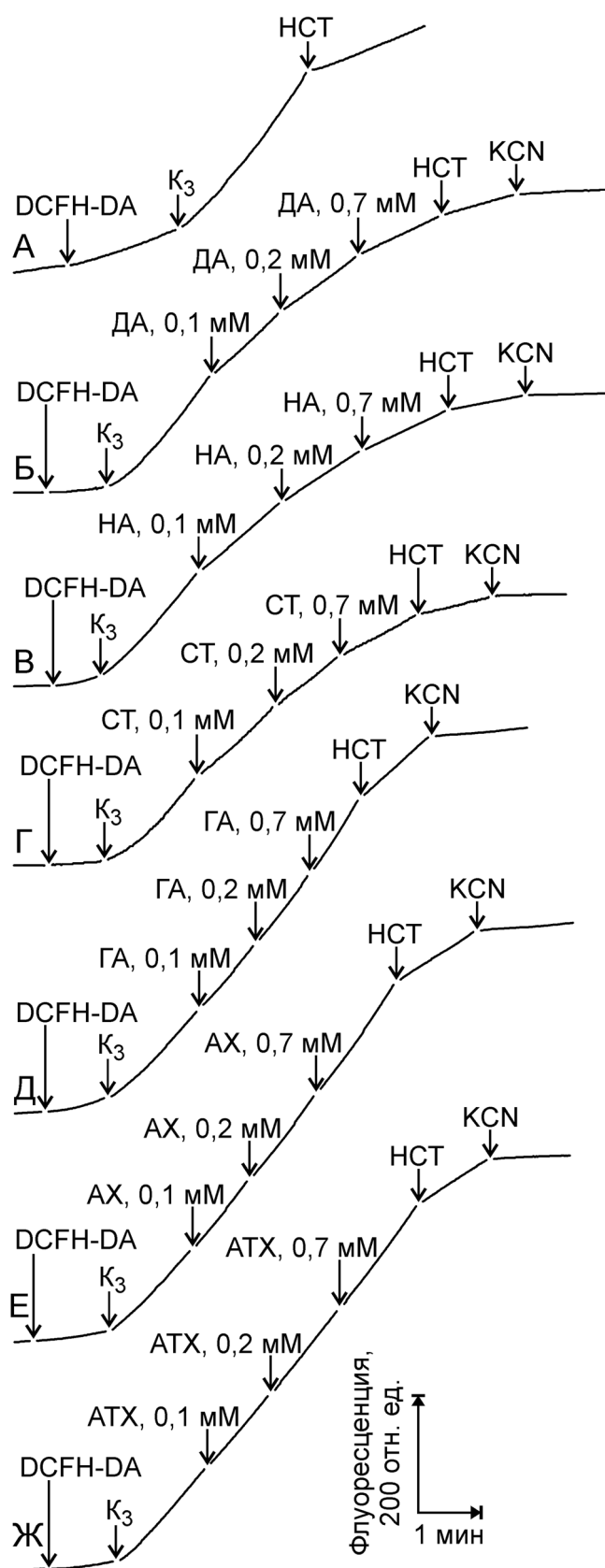


Рис. 3. Действие дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (СТ), гистамина (ГА), ацетилхолина (АХ) и ацетилтиохолина (АТХ) на скорость образования флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в пленках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 0,1 мМ менадиона (K_3), 0,2 мМ нитросинего тетразолия (НСТ), ДА, НА, СТ, ГА, АХ, АТХ, 2,5 мМ KCN.

В литературе имеются данные об антиоксидантном действии фенольных биомедиаторов — дофамина и норадреналина [29, 30]. *In vitro* их антиоксидантная активность была сравнима с эффектом антиоксиданта α -токоферола (витамина Е), а в эффективности утилизации супероксидного анион-радикала α -токоферол уступал дофамину. Антиоксидантные свойства проявлял также биогенный амин тирамин, содержащий только одну гидроксильную группу в фенольном кольце молекулы, подобно серотонину [30]. Серотонин также демонстрировал антиоксидантный эффект *in vitro* и *in vivo* [31, 32]. Дофамин, норадреналин и серотонин могут использоваться в качестве субстратов окисления пероксидазы, утилизирующей H_2O_2 [32, 33].

С другой стороны, биогенные амины могут обладать прооксидантной активностью и вызывать окислительный стресс, благоприятствуя развитию нейродегенеративных заболеваний. Участвуя в пероксидазной реакции, они способны поддерживать окисление низкомолекулярных внутриклеточных соединений, которые проявляют свойства антиоксидантов (аскорбат, НАДН), а также образовывать радикалы, вызывающие окислительное повреждение клеточных компонентов [34]. Дофамин усиливал генерацию АФК и гибель нейронов [35].

Известно, что эффект дофамина зависит от pH: при слабокислых и нейтральных значениях pH он подавлял перекисное окисление метилинOLEATA в мицеллах детергента Тритона X-100, при pH = 8 этот эффект исчезал, а при pH $\geq$ 9 дофамин, напротив, усиливал перекисное окисление. Прооксидантный эффект дофамина и других катехоламинов объясняется восстановлением O_2 с образованием супероксидного анион-радикала в реакции с окисленным катехоламином. При этом O_2 предпочтительнее реагирует не с незаряженным радикалом семихинона катехоламина, а с анион-радикалом, образующимся в растворах с щелочными значениями pH [36]. Предположительно, сходными свойствами обладают и другие фенольные биомедиаторы.

В проведенных в данной работе экспериментах наблюдались исчезновение защитного дей-

ствия дофамина и норадреналина при повышении их концентрации до 3 мМ (рис. 2, А) и губительное действие серотонина в концентрации 1–3 мМ (рис. 2, Б), что может быть связано с проявлением прооксидантной активности этих соединений. KCN, увеличивающий значение pH в водных растворах в результате защелачивания, будет способствовать уменьшению анти- и повышению прооксидантных свойств фенольных биомедиаторов.

Ранее в экспериментах с растениями наблюдали преимущественно антиоксидантный эффект биомедиаторов. Так, в корнях сои дофамин в концентрациях 0,1–1 мМ оказывал влияние на активность ферментов, связанных с утилизацией АФК, уменьшал содержание АФК ($O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2) и подавлял перекисное окисление липидов [37]. Результаты, полученные в настоящей работе, соответствуют этим наблюдениям.

Заключение

Получены данные о влиянии биомедиаторов (обладающих нейромедиаторной функцией у животных) на ПКС и образование АФК у растений. Катехоламины дофамин и норадреналин в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ защищали клетки от гибели, вызванной обработкой KCN. Серотонин, гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохолин не проявляли цитопротекторных свойств. Катехоламины, а также серотонин, в отличие от остальных испытанных соединений, действовали как антиоксиданты, снижая образование АФК в эпидермисе листьев (при pH среды ниже 8). В целом, результаты настоящего исследования дополняют данные о свойствах биомедиаторов в живых организмах и показывают, что биомедиаторы из группы катехоламинов могут защищать клетки растений от гибели, вызванной цианидом; катехоламины и серотонин предохраняют клетки от окислительного стресса.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121042600047-9. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рощина В.В. *Нейротрансмиттеры — биомедиаторы и регуляторы растений*. Пушино: Институт биологии клетки РАН; 2010. 83 с.
2. Simons F.E.R., Simons K.J. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;128(6):1139–1150.e4.
3. Roshchina V.V. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells.

Microbial endocrinology: Interkingdom signaling in infectious disease and health. Eds. M. Lyte and P.P.E. Freestone. N.Y.: Springer; 2010:17–52.

4. Kulma A., Szopa J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci.* 2007;172(3):433–440.

5. Erland L.A.E., Saxena P.K. Melatonin and serotonin in plant morphogenesis and development. *Neurotransmitters in plants: Perspectives and applications*. Eds. A. Ram-

- akrishna and V.V. Roshchina. Boca Raton: CRC Press; 2018:57–70.
6. Ramakrishna A., Mukherjee S. New insights on neurotransmitter signaling mechanisms in plants. *Plant Signal. Behav.* 2020;5(6):1737450.
 7. Vitale I., Pietrocola F., Guilbaud E., et al. Apoptotic cell death in disease – Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ.* 2023;30(5):1097–1154.
 8. Mukhtar M.S., McCormack M.E., Argueso C.T., Pajeroska-Mukhtar K.M. Pathogen tactics to manipulate plant cell death. *Curr. Biol.* 2016;26(13):R608–R619.
 9. Van Hautegeem T., Waters A.J., Goodrich J., Nowack M.K. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci.* 2015;20(2):102–113.
 10. Pitsili E., Phukan U.J., Coll N.S. Cell death in plant immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2020;12(6):a036483.
 11. Ye C., Zheng S., Jiang D., Lu J., Huang Z., Liu Z., Zhou H., Zhuang C., Li J. Initiation and execution of programmed cell death and regulation of reactive oxygen species in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12942.
 12. Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V. Participation of chloroplasts in plant apoptosis. *Biosci. Rep.* 2003;23(2–3):103–117.
 13. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5(2):227–231.
 14. Wrona M., Patel K., Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free. Radic. Biol. Med.* 2005;38(2):262–270.
 15. Karlsson M., Kurz T., Brunk U.T., Nilsson S.E., Frennsson C.I. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.* 2010;428(2):183–190.
 16. Goldberg B., Stern A. Production of superoxide anion during the oxidation of hemoglobin by menadione. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976;437(2):628–632.
 17. Hassan H.M., Fridovich I. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979;196(2):385–395.
 18. Szilagy J.T., Fussell K.C., Wang Y., Jan Y.H., Mishin V., Richardson J.R., Heck D.E., Yang S., Aleksunes L.M., Laskin D.L., Laskin J.D. Quinone and nitrofurantoin redox cycling by recombinant cytochrome b₅ reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;359:102–107.
 19. Kobayashi Y., Heber U. Rates of vectorial proton transport supported by cyclic electron flow during oxygen reduction by illuminated intact chloroplasts. *Photosynth. Res.* 1994;41(3):419–428.
 20. Huseynova I.M., Aliyeva D.R., Aliyev J.A. Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiol. Biochem.* 2014;81:54–60.
 21. Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Bakeeva L.E., Samuilov V.D. Programmed cell death in plants: Effect of protein synthesis inhibitors and structural changes in pea guard cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006;71(4):395–405.
 22. Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Shestak A.A., Samuilov V.D. Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006;71(10):1120–1127.
 23. Tunçel N., Aydın Y., Tikiz H. The effect of three products of cigarette smoke (cyanide, thiocyanate and nicotine) on the concentration-response curves of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine and epinephrine in the isolated human umbilical veins and arteries. *Pharmacol. Toxicol.* 1994;74(2):84–88.
 24. Held K.D., Sylvester F.C., Hopcia K.L., Biaglow J.E. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiat. Res.* 1996;145(5):542–553.
 25. Van Noorden C.J., Butcher R.G. The involvement of superoxide anions in the nitro blue tetrazolium chloride reduction mediated by NADH and phenazine methosulfate. *Anal. Biochem.* 1989;176(1):170–174.
 26. Kagan V.E., Tyurina Y.Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998;854(1):425–434.
 27. Duthie G., Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000;11(1):43–47.
 28. Rahman M.M., Rahaman M.S., Islam M.R., Rahman F., Mithi F.M., Alqahtani T., Almikhlaifi M.A., Alghamdi S.Q., Alruwaili A.S., Hossain M.S., Ahmed M., Das R., Emran T.B., Uddin M.S. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules*. 2021;27(1):233.
 29. Liu Q., Gao T., Liu W., Liu Y., Zhao Y., Liu Y., Li W., Ding K., Ma F., Li C. Functions of dopamine in plants: a review. *Plant Signal. Behav.* 2020;15(12):1827782.
 30. Yen G.-C., Hsieh C.-L. Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61(10):1646–1649.
 31. Erland L.A.E., Turi C.E., Saxena P.K. Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnol. Adv.* 2016;34(8):1347–1361.
 32. Huether G., Schuff-Werner P. Platelet serotonin acts as a locally releasable antioxidant. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996;398:299–306.
 33. Kalyanaraman B., Felix C.C., Sealy R.C. Peroxidatic oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach. *J. Biol. Chem.* 1984;259(12):7584–7589.
 34. Siraki A.G., O'Brien P.J. Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters. *Toxicology*. 2002;177(1):81–90.
 35. Sango J., Kakihana T., Takahashi M., Katsuragi Y., Anisimov S., Komatsu M., Fujii M. USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species-dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity. *J. Biol. Chem.* 2022;298(1):101448.
 36. Jodko-Piórecka K., Litwinienko G. Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of α -tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;83:1–11.
 37. Gomes B.R., Siqueira-Soares R.de C., Dos Santos W.D., Marchiosi R., Soares A.R., Ferrarese-Filho O. The effects of dopamine on antioxidant enzymes activities and reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Signal. Behav.* 2014;9(12):e977704.

Поступила в редакцию 21.06.2023

После доработки 09.11.2023

Принята в печать 03.12.2023

RESEARCH ARTICLE

The effect of neurotransmitters on programmed cell death and formation of reactive oxygen species in the epidermis of pea leaves

D.B. Kiselevsky^{1,*} , A.V. Oleskin² , V.D. Samuilov¹

¹Department of Immunology and ²Department of General Ecology and Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: dkiselevs@mail.ru

Neurotransmitters are found not only in animals, but also in other living organisms, including plants. They are found in other living organisms, including plants. However, the data on the functions of these compounds in the plant world are far from being comprehensive. In particular, the issue concerning their impact on plant cell death still awaits further research. In the present work, the effects of neurotransmitters on programmed cell death and the formation of reactive oxygen species (ROS) in plants were tested. Programmed cell death was estimated from the destruction of cell nuclei, and ROS was determined using 2',7'-dichlorofluorescein. Dopamine, norepinephrine, serotonin, histamine, acetylcholine and its synthetic analog acetylthiocholine were used. The catecholamines dopamine and norepinephrine at concentrations of 0.01–1 mM suppressed the destruction of guard cell nuclei in the epidermis of pea leaves, which was caused by KCN. Serotonin and acetylcholine at a concentration of 1–3 mM, on the contrary, increased the destruction of nuclei that was induced by KCN. Histamine and acetylthiocholine had no effect on KCN-dependent destruction of nuclei at concentrations of 0.01–3 mM. Acetylthiocholine at a concentration of 3 mM, in contrast to natural neurotransmitters, caused the destruction of guard cell nuclei in the absence of KCN. Dopamine, norepinephrine, and serotonin reduced the formation of ROS in the epidermis of pea leaves, which was induced by menadione. Histamine, acetylcholine and acetylthiocholine did not have a similar effect. The results demonstrate that dopamine, norepinephrine and serotonin have antioxidant properties in plants. In addition, dopamine and norepinephrine can prevent cell death.

Keywords: neurotransmitters, biogenic amines, programmed cell death, reactive oxygen species, pea

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No 121042600047-9.

Сведения об авторах

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6050-2940>

Олескин Александр Владимирович — докт. биол. наук, проф., проф. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-72; e-mail: aoleskin@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6816-1615>

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru