

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.24

Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха**Д.Б. Киселевский^{1,*} , Б.Ц. Шагдарова², В.П. Варламов², О.В. Самуилова³, В.Д. Самуилов¹**

¹Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²лаборатория инженерии биополимеров, Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российская академия наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2;

³кафедра биохимии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
*e-mail: dkiselevs@mail.ru

Испытано действие на клетки эпидермиса из листьев гороха низкомолекулярных хитозанов с молекулярной массой 5, 6, 10, 25, 45 кДа и степенью деацетилирования (СД) 85–99%, полученных при помощи химической деполимеризации и ферментативного гидролиза. Низкомолекулярный хитозан вызывал модификацию плазматической мембраны устьичных клеток, регистрируемую по изменению ее проницаемости для флуоресцирующего красителя йодида пропидия, и программируемую гибель эпидермальных клеток, определяемую по разрушению клеточных ядер. Эти эффекты были сходны с действием коммерческого высокомолекулярного хитозана с молекулярной массой 290 кДа (СД 90%), проявившимся в более высоких концентрациях, чем в случае низкомолекулярного хитозана. Губительное действие хитозана на клетки зависело в большей степени от СД и не проявлялось в концентрациях до 10 мкг/мл включительно. Низкомолекулярный хитозан усиливал образование активных форм кислорода в эпидермисе, детектируемое по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Антиоксиданты нитросиний тетразолий и пропилгаллат замедляли, а H₂O₂ стимулировал этот процесс.

Ключевые слова: программируемая клеточная смерть, плазматическая мембрана, хитозан, эпидермис, йодид пропидия, горох

Хитозан – линейный полисахарид, состоящий из остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, соединенных β-1,4-гликозидными связями. Его получают из хитина, основного структурного компонента покровов членистоногих и клеточных стенок грибов, путем частичного или полного деацетилирования [1–6]. Благодаря свободным аминогруппам в остатках глюкозамина хитозан является поликатионом в кислых средах. Это компонент клеточной стенки некоторых грибов [1, 3–5, 7]. Хитозан и его производные проявляют антибактериальную, антиоксидантную, иммуномодулирующую и противоопухолевую активность, биосовместимы (нетоксичны, слабоиммуногенны) и биоразлагаемы. Они применимы в составе пленок для упаковки и консервирования пищевых продуктов как пищевые добавки, как компонент фильтров для очистки воды, в косметике, в текстильной промышленности, при создании лекарственных форм, в составе ранозаживляющих перевязочных материалов, в сельском хозяйстве для защиты семян и повышения урожайности [6, 8].

Хитозан способен вызывать приток Ca²⁺ в цитоплазму клеток растений, влиять на митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК, *mitogen-activated protein kinase*), на экспрессию связанных с патогенезом генов *PR* (*pathogenesis-related*), образование каллозы (β-1,3-глюкана) в качестве изолирующего материала в ответ на поранение клетки, вызывать накопление фитоалексинов, синтез фитогормонов, повреждение ДНК, изменения хроматина, образование активных форм кислорода (АФК) и иммунный (гиперчувствительный) ответ, сопровождающийся локальной гибелью клеток [3]. Хитозан обладает противовирусным действием: уменьшает некротические повреждения листьев растений, вызванные вирусами, в том числе вирусом табачной мозаики [3, 9]. Хитозан и его производные подавляют рост фитопатогенных грибов и бактерий [5, 6]. Обработка хитозаном перспективна для увеличения срока хранения овощей и фруктов, их защиты от гнили и плесени [1, 3].

Хитин относится к элиситорам, способным инициировать иммунный ответ у растений. Ре-

цепторы, связывающие хитин, не пригодны для распознавания хитозана [3]. Поиск белков на поверхности клеток листьев пшеницы, способных взаимодействовать с хитозаном, выявил несколько возможных рецепторов хитозана: они связывают хитозан, расположены в плазматической мембране и обладают киназной активностью [10].

Чтобы проникнуть в клетки, многие фитопатогены используют устьица на поверхности листьев растений. Обработка эпидермиса гороха хитозаном в концентрации 5 мкг/мл и выше вызывала закрытие устьиц, которое сопровождалось образованием АФК и NO [11]. Олигосахариды на основе хитина и хитозана (октамеры из остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина соответственно) обладали различным действием на замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) *Arabidopsis thaliana*. Хитиновый олигосахарид индуцировал закрытие устьиц, а хитозановый октамер не вызывал закрытия устьиц, но в более высоких концентрациях (от 60 мкМ или ~80 мкг/мл) индуцировал гибель устьичных клеток [12].

Хитозан вызывал программируемую клеточную смерть (ПКС) основных клеток эпидермиса (эпидермальных клеток) листьев гороха. ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер. Зависимому от хитозана распаду ядер эпидермальных клеток предшествовали конденсация, маргинация хроматина и межнуклеосомная фрагментация ДНК. Хитозан не приводил к разрушению ядер устьичных клеток [13]. Анаэробии и антиоксиданты, в том числе митохондриально-направленные антиоксиданты (SkQ), подавляли действие хитозана на ядра эпидермальных клеток [13, 14]. Хитозан-индуцированное разрушение ядер эпидермальных клеток листьев гороха чувствительно к ингибиторам альтернативной оксидазы митохондрий, NADPH-оксидазы плазматической мембраны, синтеза белка и аутофагии [13]. Хитозан увеличивал активность протеинкиназы в клетках эпидермиса листьев и стимулировал образование АФК в устьичных клетках. При увеличении концентрации хитозана прекращалось разрушение клеточных ядер, но наблюдалось повреждение плазматической мембраны, определяемое по проникновению в клетки красителя йодида пропидия (PI) [15, 16].

Хитозан плохо растворим в воде. Для повышения растворимости его подвергают деполимеризации, получая низкомолекулярный хитозан [2, 4].

Целью настоящей работы являлись исследование действия низкомолекулярного хитозана на клетки растений и сравнение его с действием высокомолекулярного хитозана. Объект исследования — эпидермис из листьев гороха, монослой клеток, удобный для обработки клеток реагентами и микроскопии.

Материалы и методы

Образцы низкомолекулярного хитозана получали с использованием химической деполимеризации и ферментативного гидролиза. При химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана использовали соляную кислоту. Для этого хитозан ресуспендировали в 6 М соляной кислоте при перемешивании (3 ч, 90°C). Выход составлял 45–50% [2]. Для ферментативного гидролиза высокомолекулярного хитозана использовали ферментный комплекс, продуцируемый *Myceliophthora* sp. Для получения различных молекулярных масс (ММ) использовали различные соотношения фермент–субстрат. Реакцию проводили при pH 5,4–5,6, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 15 мин. Выход образцов хитозана в зависимости от ММ составлял 50–80%. [17]. Полученные хитозаны были охарактеризованы с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ММ) и протонного магнитного резонанса (степень деацетилирования — СД). Свойства низкомолекулярного хитозана и коммерческого хитозана «Fluka» (Германия) с высокой ММ приведены в таблице.

Таблица

Свойства полученных образцов хитозана и хитозана фирмы «Fluka»

Хитозан	Средневесовая молекулярная масса, кДа	Степень деацетилирования, %
низкомолекулярный	5	85
низкомолекулярный	6	98–99
низкомолекулярный	10	85
низкомолекулярный	25	98–99
низкомолекулярный	45	98–99
высокомолекулярный, «Fluka»	290	90

Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 11–19-суточных проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Альфа. Эпидермис представляет собой монослой из клеток двух типов: устьичных и эпидермальных. Эпидермальные клетки являются частью симпласта листа — они соединены между собой и с клетками мезофилла плазмодесмами. Устьичные клетки изолированы — плазмодесмы связывают только две соседние клетки устьища [18]. Растения выращивали в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ Reflux, 250 Вт, с интенсивностью 70–100 мкЕ/(м²с) при 22–28°C. Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду (50 мл), добавляли хитозан (концентрация отмечена на рисунках или в подписях к ним) и инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке (400 об./мин), а затем без перемешивания в темноте 2 ч (с последующим определением проницаемости плазматической

мембраны) или 22–24 ч (после чего оценивали разрушение клеточных ядер). Условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

Проницаемость плазматической мембраны клеток определяли с помощью флуоресцирующего красителя PI, связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через нативную мембрану [19]. Пленки эпидермиса окрашивали 20 мин посредством 2 мкМ PI. Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия). Флуоресценцию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Определяли долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [20]. 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, окрашивали 40 мин гематоксилином Карацци. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водопроводной водой и исследовали с помощью световой микроскопии. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами, а также клеток, лишенных ядер.

В каждом варианте эксперимента исследовали 300–650 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся данные типичных экспериментов, указаны средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

АФК в клетках детектировали по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) [21]. Пленку эпидермиса, закрепленную на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ трицин-КОН, pH 7,8, с 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂. В кювету последовательно добавляли нефлуоресцирующий диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA) и другие реагенты. DCFH-DA проникает в клетки через плазматическую мембрану, деацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H₂O₂ с участием пероксидаз, превращаясь в флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [22]. Флуоресценцию DCF измеряли на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad, США), возбуждая ее светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Результаты и обсуждение

С использованием ферментативного гидролиза получены образцы хитозана с ММ 5 и 10 кДа и СД 85%. Химической деполимеризацией получены хитозаны с ММ 6, 25, 45 кДа и СД 98–99% (таблица). Испытано действие этих препаратов на

клетки эпидермиса из листьев гороха. В экспериментах также использовали коммерческий хитозан фирмы «Fluka» с ММ 290 кДа и СД 90%.

Хитозаны в концентрации 0,1 мг/мл с ММ 6, 25 или 45 кДа после инкубации в течение 2,5 ч индуцировали проницаемость плазматической мембраны для PI у всех устьичных клеток (рис. 1). Препараты с ММ 5 или 10 кДа, а также хитозан «Fluka» не обладали подобным действием. Видимо, их эффект зависит не от ММ хитозана, а определяется его СД (таблица). Ни низкомолекулярные хитозаны (5, 6, 10, 25 или 45 кДа), ни высокомолекулярный хитозан «Fluka» не приводили к разрушению ядер устьичных клеток. Хитозан с ММ 5–45 кДа после односуточной инкубации не вызывал ПКС эпидермальных клеток в отличие от коммерческого хитозана «Fluka», который увеличивал долю клеток с разрушенными ядрами (рис. 1).

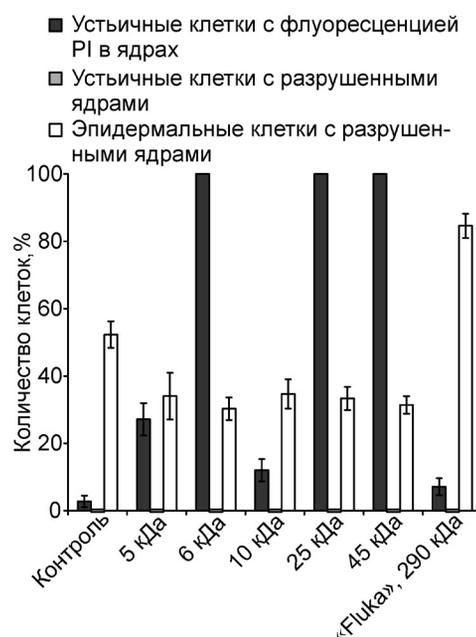


Рис. 1. Действие образцов хитозана на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI и состояние ядер устьичных и эпидермальных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. Пленки эпидермиса в биодистиллированной воде без добавок (контроль) или в суспензии 0,1 мг/мл хитозана инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Затем инкубировали без перемешивания 2 ч, окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах или инкубировали 22 ч и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. На рисунке отмечены молекулярные массы образцов хитозана и вариант с хитозаном фирмы «Fluka». Приведены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

Исследован эффект хитозана с ММ 5 или 6 кДа в более низкой концентрации: 3–30 мкг/мл. Из испытанных вариантов только хитозан 6 кДа в концентрации 30 мкг/мл увеличивал проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI (рис. 2). Разрушение ядер эпидермальных клеток посредством хитозана 5 кДа наблюдалось лишь при концентрации 30 мкг/мл.

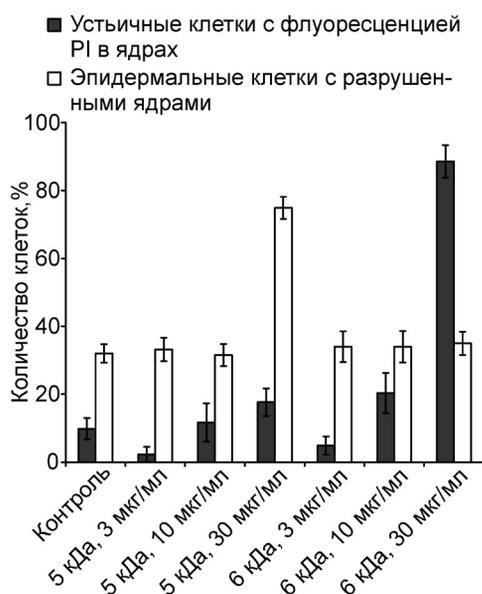


Рис. 2. Действие низкомолекулярных хитозанов на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI и состояние ядер эпидермальных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. Пленки эпидермиса в бидистиллированной воде без добавок (контроль) или в суспензии хитозана инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Затем инкубировали без перемешивания 2 ч, окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах или инкубировали 24 ч и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. На рисунке отмечены молекулярные массы образцов хитозана и их концентрации. Приведены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

Как было показано ранее [16], концентрация хитозана «Fluka», при которой происходило разрушение ядер эпидермальных клеток листьев гороха, составляла 0,1 мг/мл. В более высокой концентрации (1 мг/мл) этот хитозан вызывал изменение плазматической мембраны устьичных клеток, которое приводило к проникновению в клетки красителя PI. Эти данные в сочетании с данными, представленными на рис. 1 и 2, свидетельствуют о том, что испытанные препараты низкомолекулярного хитозана повреждают плазматическую мембрану и разрушают ядра клеток в более низких концентрациях, чем хитозан «Fluka». В диапазоне 3–100 мкг/мл не удалось обнаружить концентрацию, при которой разрушение ядер вызывал бы хитозан 6 кДа.

Повреждение плазматической мембраны клеток, по-видимому, препятствует разрушению ядер при ПКС, поскольку с разными образцами и концентрациями хитозана его разрушительное действие проявлялось либо в увеличении доли клеток с проницаемой для PI плазматической мембраной, либо в повышении числа клеток с разрушенными клеточными ядрами, но не то и другое совместно. Для прохождения PI в клетки достаточно 2 ч инкубации с хитозаном (после 30 мин обработки хитозаном при перемешивании), а для разрушения ядер – более длительный срок. Про-

никновение PI в клетки эпидермиса можно наблюдать, даже если клеточные ядра разрушены [16]. Низкомолекулярный хитозан с ММ 5 или 6 кДа в концентрации 10 мкг/мл и ниже не вызывает гибели клеток и деструктивных изменений клеточной мембраны (рис. 2).

Низкомолекулярный хитозан с ММ 5, 6 или 10 кДа стимулировал образование АФК в эпидермисе листьев гороха: рост флуоресценции DCF, образующегося из нефлуоресцирующего DCFH-DA (рис. 3). Такое же действие на клетки эпидермиса оказывал хитозан «Fluka» [15]. Антиоксиданты нитросиний тетразолий и пропилгаллат снижали скорость роста флуоресценции DCF, а H_2O_2 ускорял ее рост (рис. 3).

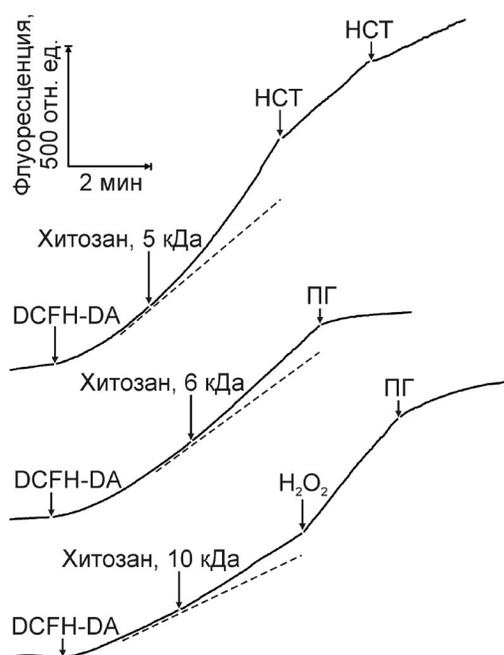


Рис. 3. Действие хитозана на флуоресценцию DCF в пленках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 0,1 мг/мл низкомолекулярного хитозана (молекулярные массы отмечены на рисунке), 0,2 мМ нитросинего тетразолия (НСТ), 1 мМ пропилгаллата (ПГ), 20 мкМ H_2O_2 . Прерывистыми линиями отмечен рост флуоресценции DCF до добавки хитозана.

Генерация АФК – одна из наиболее быстрых реакций клеток растений на хитозан. Время, необходимое на ее проявление в устьичных клетках, составляет не более 5 мин [11]. После этого происходит закрытие устьиц, препятствующее проникновению патогенов. Такая реакция на патогенные грибы может стимулироваться хитиназами растений, которые гидролизуют хитин клеточных стенок гриба до олигомеров, доступных для рецепторов на плазматической мембране клеток растений. Для противодействия этой защите фитопатоген способен применять деацетилазы хитина, трансформирующие хитиновые олигосахариды в хитозановые, которые не только не распознаются хитиновым рецептором, но в высоких концентрациях могут вести к повреждению и гибели устьич-

ных клеток, открывая патогену доступ в лист через устьица [12].

Таким образом, губительное действие хитозана на клетки зависело в большей степени от СД и не наблюдалось в концентрациях до 10 мкг/мл включительно. Низкомолекулярный хитозан с высокой СД (98–99%) индуцировал проницаемость плазматической мембраны для PI у устьичных клеток, действуя в более низкой концентрации, чем высокомолекулярный хитозан «Fluka». Все испытанные образцы низкомолекулярного хитозана в концентрации 0,1 мг/мл не вызывали разрушения ядер эпидермальных клеток, в отличие от коммерческого хитозана. Низкомолекулярный

хитозан (5, 6 или 10 кДа) усиливал образование АФК в эпидермисе.

Работа по получению и анализу низкомолекулярных хитозанов частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-016-00205). Работа выполнена при финансовой поддержке научно-исследовательской работы (НИР) из средств федерального бюджета (регистрационный номер НИР в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Феофилова Е.П.* Клеточная стенка грибов М.: Наука, 1983. 248 с.
2. *Shagdarova B.T., Il'ina A.V., Varlamov V.P.* Antibacterial activity of alkylated and acylated derivatives of low-molecular weight chitosan // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. Vol. 52. N 2. P. 222–225.
3. *Hadwiger L.A.* Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype // *Plant Sci.* 2013. Vol. 208. P. 42–49.
4. *Davydova V.N., Yermak I.M.* The conformation of chitosan molecules in aqueous solutions // *Biophysics.* 2018. Vol. 63. N 4. P. 501–511.
5. *Varlamov V.P., Il'ina A.V., Shagdarova B.T., Lunkov A.P., Mysyakina I.S.* Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches // *Biochemistry (Mosc).* 2020. Vol. 85. Suppl. 1. P. S154–S176.
6. *Wang W., Xue C., Mao X.* Chitosan: Structural modification, biological activity and application // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 164. P. 4532–4546.
7. *Young D.H., Köhle H., Kauss H.* Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. N 5. P. 1449–1454.
8. *Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 105. Pt. 2. P. 1358–1368.
9. *Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J.* Induction of antiviral resistance in plants by chitosan // *Plant Sci.* 1991. Vol. 79. N 1. P. 63–68.
10. *Liu D, Jiao S, Cheng G, Li X, Pei Z, Pei Y, Yin H, Du Y.* Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 111. P. 1083–1090.
11. *Srivastava N., Gonugunta V.K., Puli M.R., Raghavendra A.S.* Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum* // *Planta.* 2009. Vol. 229. N 4. P. 757–765.
12. *Ye W., Munemasa S., Shinya T., Wu W., Ma T., Lu J., Kinoshita T., Kaku H., Shibuya N., Murata Y.* Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. Vol. 117. N 34. P. 20932–20942.
13. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Zinovkin R.A., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Samuilov V.D.* Chitosan-induced programmed cell death in plants // *Biochemistry (Mosc).* 2009. Vol. 74. N 9. P. 1035–1043.
14. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: protective effect of mitochondrial-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc).* 2011. Vol. 76. N 10. P. 1120–1130.
15. *Kiselevsky D.B., Frolova O.Y., Solovyev A.G., Dorokhov Y.L., Morozov S.Y., Samuilov V.D.* Plant cell death caused by fungal, bacterial, and viral elicitors: protective effect of mitochondria-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc).* 2014. Vol. 79. N 12. P. 1322–1332.
16. *Kiselevsky D.B., Samuilov V.D.* Permeability of the plasma membrane for propidium iodide and destruction of cell nuclei in the epidermis of pea leaves: the effect of polyelectrolytes and detergents // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 147–153.
17. *Khasanova L.M., Il'ina A.V., Varlamov V.P., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P.* Hydrolysis of chitozan with an enzyme complex from *Myceliophthora* sp. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. Vol. 50. N 4. P. 381–386.
18. *Luttge U., Higinbotham N.* Transport in plants. N.Y.: Springer Verlag, 1979. 468 pp.
19. *Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // *Cytometry.* 1992. Vol. 13. N 8. P. 795–808.
20. *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. Vol. 23. N 2–3. P. 103–117.
21. *Samuilov V.D., Kiselevsky D.B., Shestak A.A., Nesov A.V., Vasil'ev L.A.* Reactive oxygen species in programmed death of pea guard cells // *Biochemistry (Mosc).* 2008. Vol. 73. N 10. P. 1076–1084.
22. *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. Vol. 428. N 2. P. 183–190.

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 05.02.2021 г.

Принята в печать 08.02.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of low molecular weight chitosan on epidermal cells from pea leaves

D.B. Kiselevsky^{1,*} , B.Ts. Shagdarova², V.P. Varlamov², O.V. Samuilova³, V.D. Samuilov¹

¹Department of Immunology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Laboratory of Biopolymer Engineering, Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky ave. 33/2, Moscow, 119071, Russia;

³Department of Biochemistry, I.M. Sechenov University, Trubetskaya str. 8–2, Moscow, 119991, Russia
*e-mail: dkiselevs@mail.ru

The effect of low molecular weight (MW) chitosans with a MW of 5, 6, 10, 25, 45 kDa and a deacetylation degree (DD) of 85–99% obtained by chemical depolymerization and enzymatic hydrolysis on the cells of the epidermis of pea leaves was analyzed. Low MW chitosans induced guard cells plasma membrane damage, which was estimated from the change in its permeability for the fluorescent dye propidium iodide, and programmed death of epidermal cells determined from destruction of cell nuclei. These effects are similar to those of commercial high MW chitosan with a MW of 290 kDa, a DD of 90%, which was manifested at higher concentrations than with low MW chitosan. The destructive effect of chitosan on the cells was predominantly DD-dependent, and it was not produced at concentrations up to 10 µg/ml inclusive. Low MW chitosan enhanced the generation of reactive oxygen species in the epidermis, which was detected by monitoring the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein. The antioxidants nitroblue tetrazolium and propyl gallate inhibited, and H₂O₂ accelerated this process.

Keywords: *programmed cell death, plasma membrane, chitosan, epidermis, propidium iodide, pea*

Funding: The research on the production and analysis of low molecular weight chitosans was partially supported by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-016-00205. This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A16-116021660081-0.

Сведения об авторах

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

Шагдарова Бальжима Цырендоржиевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории инженерии биополимеров Института биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-65-56; e-mail: shagdarova.bal@gmail.com

Варламов Валерий Петрович – докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией инженерии биополимеров Института биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-65-56; e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Самуилова Ольга Витальевна – канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-495-622-96-73; e-mail: olga.v.samuilova@gmail.com

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