

рН-ЗАВИСИМЫЕ РЕДОКС-СВОЙСТВА ГАЛЛАТА ЭПИГАЛЛОКАТЕХИНА (EGCG) И ЕГО ДЕЙСТВИЕ НА ДЫХАНИЕ, ФОТОСИНТЕЗ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ГОРОХА

© 2023 Д.Б. Киселевский^{1*}, О.В. Самуилова², В.Д. Самуилов¹

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

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Институт биодизайна и моделирования сложных систем, кафедра биологической химии,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.11.2022

После доработки 12.01.2023

Принята к публикации 13.01.2023

Исследованы редокс-свойства компонента зеленого чая галлата эпигаллокатехина (EGCG) *in vitro*, и испытано его действие на клетки растений (гороха). EGCG проявлял свойства как про-, так и антиоксиданта. В растворах EGCG окислялся кислородом при физиологических (слабощелочных) значениях pH. Снижение pH замедляло этот процесс. Окисление EGCG сопровождалось образованием O_2^- и H_2O_2 . С другой стороны, EGCG функционировал в качестве донора электронов для пероксидазы и в комбинации с ней утилизировал H_2O_2 . При воздействии на клетки гороха (высечки листьев или эпидермис) EGCG подавлял дыхание, снижал трансмембранную разность электрических потенциалов в митохондриях и ингибировал транспорт электронов в фотосинтетической электронтранспортной цепи. Из участков фотосинтетической редокс-цепи фотосистема II обладала наименьшей чувствительностью к действию EGCG. EGCG снижал скорость образования активных форм кислорода в эпидермисе, которое вызывали обработкой NADH и определяли с помощью диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцина. *In vivo* EGCG в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ подавлял KCN-индуцированную гибель устьичных клеток в эпидермисе, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер. В концентрации 10 мМ EGCG вызывал нарушение барьерной функции плазматической мембраны устьичных клеток, увеличивая ее проницаемость для йодида пропидия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: EGCG, пероксидаза, активные формы кислорода, гибель клеток, горох.

DOI: 10.31857/S0320972523020021, **EDN:** QFUCIO

ВВЕДЕНИЕ

Галлат эпигаллокатехина или эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) — соединение из группы катехинов, относящихся к флавоноидам (полифенолам растений). О структуре и свойствах катехинов и EGCG см. обзор М. Farhan [1]. Высушенные чайные листья — основной источник катехинов и EGCG. Листья зеленого чая содержат наибольшее количество EGCG. В заваренном зеленом чае его 20–30 мг на 100 мл (около 0,5 мМ).

Выявлено профилактическое действие зеленого чая на онкологические заболевания. Исследование, проведенное в Японии, показало, что риск возникновения рака уменьшался у лиц, употребляющих более 10 чашек чая в день, особенно у женщин [2]. Этот эффект зеленого чая считают обусловленным EGCG, противоопухолевое действие которого наблюдалось в разных типах опухолей [3, 4].

EGCG обладает разнообразной активностью на молекулярном и клеточном уровнях. Он проявлял свойства антиоксиданта сам

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ПКС — программируемая клеточная смерть; ТМФД — N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; ЭТЦ — электронтранспортная цепь; Amplex Red — N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин; DCF — 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA — диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина; EGCG — галлат эпигаллокатехина; PI — йодид пропидия; TMRE — этиловый эфир тетраметилродамина; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

по себе или в результате активации в клетках ферментов антиоксидантной защиты [3, 5, 6]. Идентифицировано много белков, чувствительных к EGCG. Среди них есть ферменты, которые связаны с развитием опухолей и регулируют: 1) клеточный цикл (циклины, циклин-зависимые и другие регуляторные протеинкиназы, транскрипционные факторы), 2) апоптоз (белки семейства Bcl-2, каспазы, Araf-1, XIAP) и 3) воспаление (цитокины, NO-синтаза). Некоторые белки непосредственно взаимодействуют с EGCG [3, 7]. Так, EGCG напрямую связывается с *N*-концевым участком опухолевого супрессора p53, препятствуя его контакту с E3-убиквитинлигазой MDM2 и последующему убиквитинированию и деградации p53 [8].

Выявлен терапевтический эффект EGCG в отношении ряда инфекционных заболеваний, вызванных вирусами. Механизмы противовирусного действия EGCG различаются в зависимости от инфекционного агента, но в ряде случаев его мишенью является вирусная оболочка. Антибактериальный эффект EGCG проявляет сам по себе или в сочетании с различными антибиотиками [9]. Имеются сведения об эффективности EGCG против патогенных грибов. У дрожжей и грамотрицательных бактерий EGCG нарушает метаболизм фолиевой кислоты, имитируя действие сульфаниламидов и триметоприма [9]. EGCG обладал противовирусным действием в отношении SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19). Молекулярное моделирование предполагает взаимодействие EGCG с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка вируса, которое нарушает его связывание с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности клеток [10].

У растений флавоноиды, к которым относится EGCG, известны как регуляторы процессов онтогенеза, репродукции, гибели клеток, взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами [11]. Они принимают участие в защите растений от патогенов, предохраняют клетки от ультрафиолетового излучения [12]. Однако о белках, с которыми взаимодействуют флавоноиды в клетках растений, известно мало. Сведения о действии EGCG на клетки растений немногочисленны. Есть данные о том, что EGCG повышает устойчивость растений к инфицированию путем активации сигнального пути жасминовой кислоты, обеспечивающего защиту от некротрофных патогенов [13].

EGCG окисляется в растворе с нейтральным или щелочным значениями pH. Его окисление сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК) [14]. Таким образом,

это соединение проявляет свойства как антиоксиданта, так и прооксиданта.

Цель работы — исследовать окислительно-восстановительные свойства EGCG *in vitro*, определить, как влияет на них pH и среда инкубации. Учитывая полученные результаты, испытать эффект EGCG на клетки листьев гороха, включая функции, связанные с энергетическим обменом (дыхание, генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в митохондриях и фотосинтез), образование АФК и программируемую клеточную смерть (ПКС). Про- или антиоксидантные свойства EGCG будут преобладать при его воздействии на клетки растений?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оксиметрия, дыхание и фотосинтез. Содержание O_2 в растворе регистрировали в полярографической ячейке объемом 1,5 мл при помощи закрытого платинового электрода, подключенного к аналого-цифровому преобразователю Record4 (Пушино, Россия), с использованием сопутствующего программного обеспечения. Определяли поглощение O_2 при дыхании и фотосинтетическое выделение O_2 . Состав среды инкубации и добавляемые реагенты представлены в подписях к рисункам.

Образование H_2O_2 . Содержание H_2O_2 в растворе измеряли методом флуориметрии с применением N-ацетил-3,7-дигидроксибензоказина (Amplex Red). Реакция нефлуоресцирующего Amplex Red с H_2O_2 катализируется пероксидазой и ведет к образованию флуоресцирующего резорурфина [15, 16]. Использовали пластиковую кювету с 2 мл среды инкубации. Флуоресценцию резорурфина детектировали с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad», США), возбуждая ее при 505–515 нм и регистрируя при 585–595 нм.

Объект исследования. Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорт Альфа) выращивали 9–17 сут. при периодическом освещении (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРиЗ, 250 Вт, с интенсивностью света $\sim 100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания). Высечки листьев получали с помощью пластиковой трубки. Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

$\Delta\psi$ в митохондриях клеток оценивали по накоплению в них флуоресцирующего проникающего через мембраны катиона этилового эфира тетраметилродамина (TMRE). Изобра-

жения клеток получали с помощью микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония), пользуясь программным обеспечением NIS-Elements. Флуоресценцию TMRE возбуждали светом лазера 532 нм и регистрировали при 570–620 нм.

Активные формы кислорода. АФК в клетках гороха определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). В клетках DCFH-DA окисляется АФК, превращаясь во флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром *c*, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [17, 18]. Пленку эпидермиса, закрепленную на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации. В кювету последовательно добавляли DCFH-DA и другие реагенты. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad»), возбуждая ее светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Инкубация клеток с реагентами. Для определения действия химических соединений на состояние клеток пленки эпидермиса помещали в ячейки в полистирольных планшетах с 2 мл бидистиллированной воды, добавляли реагенты и инкубировали. Контроль – без добавок реагентов. Условия инкубации представлены в подписях к рисункам.

Мертвые клетки. Гибель клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [19]. После инкубации эпидермис 5 мин обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1), промывали в этиловом спирте и воде в течение 10 и 5 мин соответственно, затем окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци в течение 1 ч. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишенных ядер.

Целостность клеточной мембраны. Проницаемость плазматической мембраны клеток выявляли с помощью флуоресцирующего красителя йодида пропидия (PI), связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через неповрежденную мембрану [20]. После инкубации пленки эпидермиса окрашивали (2 мкМ PI) в течение 20 мин и исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss»). Флуоресцен-

цию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Подсчитывали долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

Статистика. Для определения количества клеток с разрушенными ядрами или с проницаемой для PI клеточной мембраной в каждом варианте опыта исследовали 300–600 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов. На диаграммах отмечены средние значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы (уровень значимости $\alpha = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие EGCG *in vitro*. EGCG окислялся в буферном растворе с pH 7,8 (рис. 1, *а*). Поглощение O_2 , регистрируемое с помощью оксиметра, прекращалось при изменении pH раствора до 7,0 добавкой соляной кислоты и возобновлялось при последующем добавлении щелочи до значения pH 7,8. Скорость окисления EGCG зависела от pH среды инкубации, возрастая при слабощелочных и снижаясь при слабокислых значениях pH (рис. 1, *б*).

Добавка каталазы в процессе окисления EGCG (pH 7,8) вызывала выделение O_2 , свидетельствуя об образовании H_2O_2 (рис. 2, *а*). O_2 выделялся также при последующем внесении H_2O_2 в среду инкубации. Пероксидаза хрена, добавленная перед каталазой, предотвращала выделение O_2 (рис. 2, *б*). Супероксиддисмутаза снижала скорость поглощения O_2 (рис. 2, *в*). Это, по-видимому, обусловлено выделением O_2 в супероксиддисмутазной реакции и свидетельствует об образовании супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) при окислении EGCG. Инкубация H_2O_2 с пероксидазой без EGCG не отменяла выделения O_2 при добавке каталазы (рис. 2, *г*; сравнить с 2, *б*).

H_2O_2 детектировали с помощью Amplex Red при pH 6,0, когда окисление EGCG подавляется (рис. 1, *б*). H_2O_2 в комбинации с пероксидазой и Amplex Red вызывал образование флуоресцирующего резорупина (рис. 3, *а*). Генерацию H_2O_2 наблюдали после добавок пероксидазы и NADH независимо от их последовательности (рис. 3, *б* и *в*) в результате пероксидазно-оксидазных реакций, сопровождающихся образованием АФК ($O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2) [21–24]. Каталаза подавляла продукцию H_2O_2 (рис. 3, *б*). EGCG в микромолярных концентрациях снижал скорость образования H_2O_2 (рис. 3, *в*).

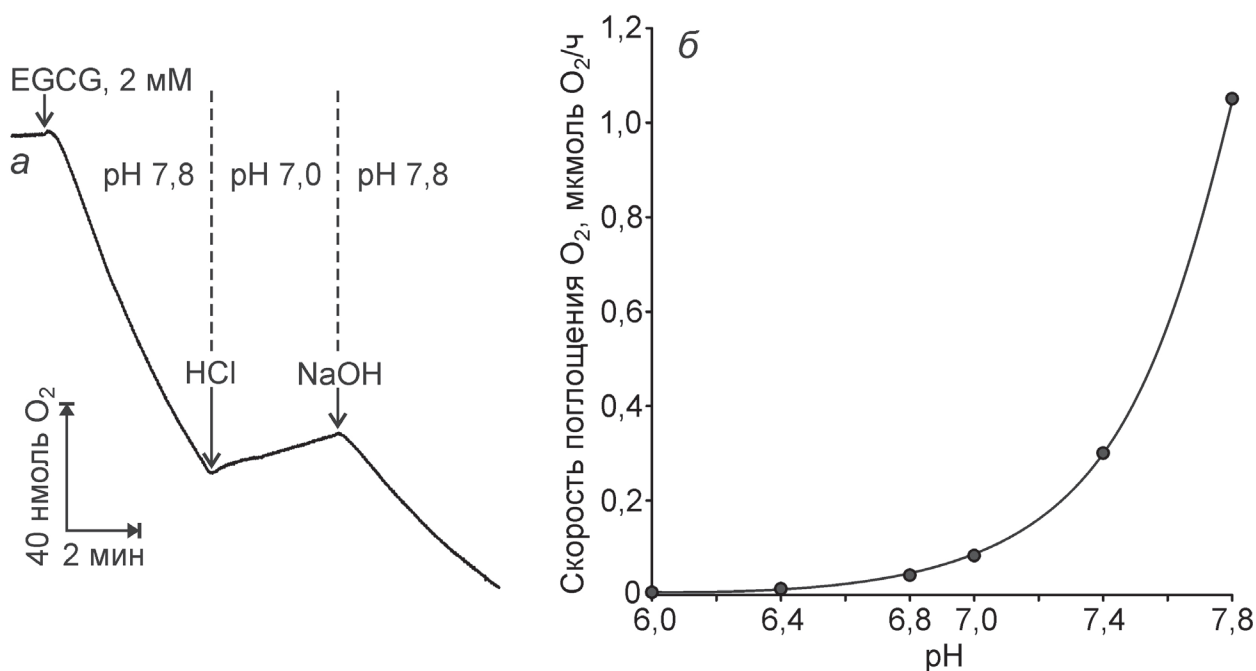


Рис. 1. Окисление EGCG в среде инкубации (а), зависимость скорости его окисления от pH среды инкубации (б). Среда инкубации — буфер 50 мМ Tricine—KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$ (а) или буфер 50 мМ KH_2PO_4 —NaOH (pH 6—7,8) с 1 мМ $MgCl_2$ (б). pH среды изменяли добавкой HCl или NaOH (а). Добавки: 2 мМ EGCG, HCl, NaOH

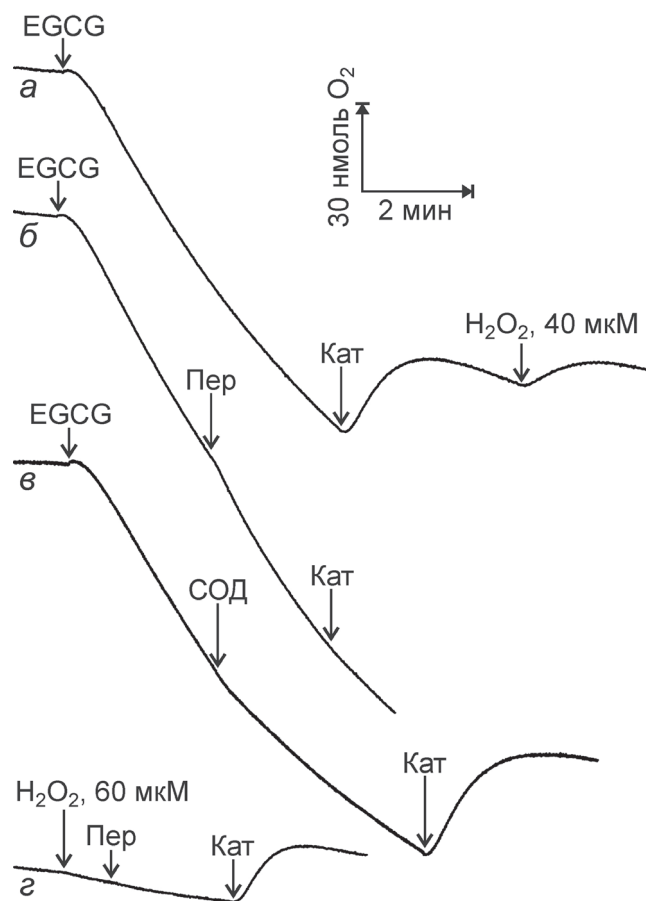


Рис. 2. Действие каталазы (Кат), H_2O_2 , пероксидазы хрена (Пер) и супероксиддисмутазы (СОД) на окисление EGCG. Среда инкубации — буфер 50 мМ Tricine—KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$. Добавки: 2 мМ EGCG, 40 ед. активности/мл Кат, H_2O_2 , 20 ед. активности/мл Пер, 60 ед. активности/мл СОД

Даже в среде инкубации с pH 7,8, где происходит окисление EGCG (рис. 1), EGCG в комбинации с пероксидазой подавлял генерацию H_2O_2 (рис. 3, в). В растворе с pH 7,8 продукция H_2O_2 была выше, а эффективность EGCG — меньше, чем при pH 6,0. EGCG в концентрации 2 мМ тоже предотвращал образование H_2O_2 (при pH 6,0 и 7,8, данные не представлены).

Полученные результаты показывают, что EGCG не только окисляется в слабощелочном растворе с поглощением O_2 (рис. 1), но и генерирует H_2O_2 (рис. 2, а). Это соответствует данным литературы: EGCG восстанавливает O_2 до $O_2^{\cdot -}$, приводя к накоплению H_2O_2 . При окислении из EGCG формируются его димеры (теаениненины А и D), которые нестабильны и впоследствии образуют ряд других химических соединений, некоторые из них обладают цитотоксичностью [14]. При этом EGCG функционирует в качестве субстрата пероксидазы (рис. 2, б и в). В комбинации с пероксидазой EGCG утилизирует H_2O_2 , образующийся в результате автоокисления (рис. 2) или пероксидазно-оксидантных реакций с NADH (рис. 3). Таким образом, в зависимости от условий (pH, пероксидазная активность) EGCG может действовать как про- или антиоксидант.

Следует отметить, что диапазон значений pH, в котором меняется скорость окисления EGCG (рис. 1, б), близок к физиологическому. Так, в митохондриях клеточной линии эндотелия человека ECV304 были измерены

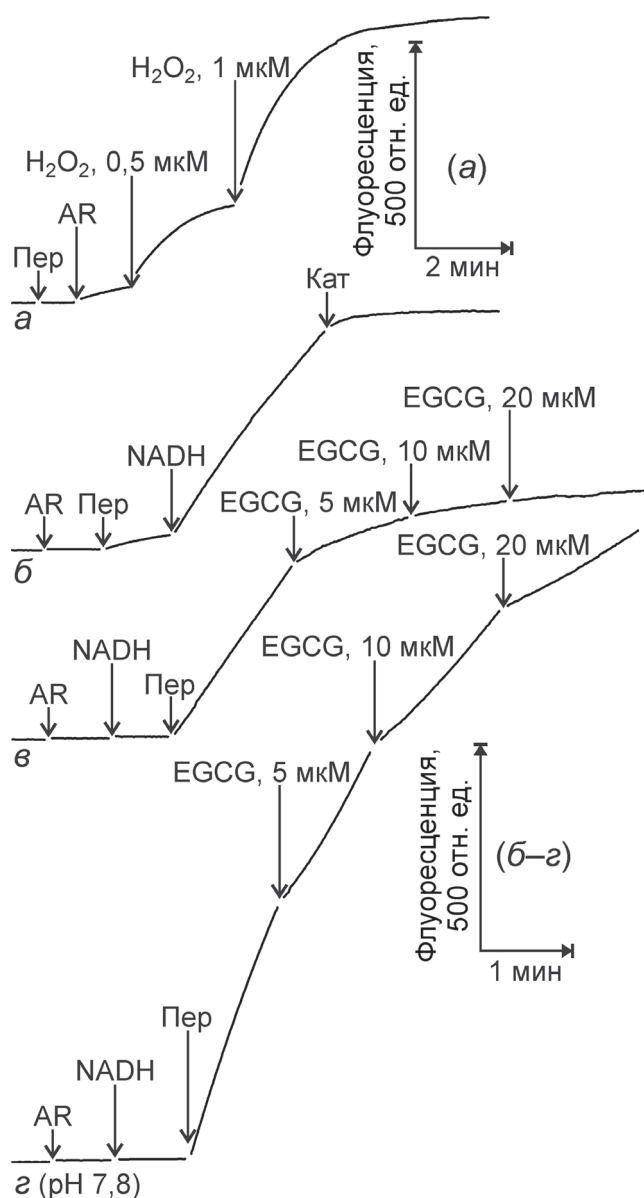


Рис. 3. Действие EGCG на скорость образования флуоресцирующего резорфина при окислении нефлуоресцирующего Amplex Red (AR) пероксидазой хрена (Пер). Среда инкубации – буфер 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$ (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 (а–б) или буфер 50 мМ Tricine–KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl_2 (в). Добавки: 0,1 ед. активности/мл Пер; 5 мМ H_2O_2 ; 0,1 мМ NADH; 40 ед. активности/мл каталазы (Кат); EGCG

значения pH с помощью pH-чувствительного флуоресцирующего белка, введенного в разные компартменты клетки. Они составили: в цитоплазме – 7,6; в матриксе митохондрий – 7,8; в митохондриальном межмембранном пространстве – 6,9 [25]. В разных компартментах клетки скорости окисления EGCG и ассоциированной с этим продукции H_2O_2 должны различаться.

Эффекты EGCG *in vivo*. Испытано действие EGCG на клетки в листьях гороха. В концентрации 0,1–10 мМ он уменьшал скорость

дыхания в высечках листьев гороха (рис. 4), которое определяли оксиметрически по поглощению O_2 . Эксперимент проводили в среде с pH 6,0, когда окисление EGCG тормозится (рис. 1, б).

Данные литературы о действии EGCG на митохондрии противоречивы. В митохондриях, изолированных из печени крыс, наблюдали связывание EGCG с комплексами дыхательной электротранспортной цепи (ЭТЦ). При этом EGCG в концентрации до 0,1 мМ снижал их активность, особенно комплексов II и III (но не более чем на 30%). Действие EGCG усиливалось при индукции Ca^{2+} -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий, а ее ингибитор циклоспорин А предотвращал этот эффект. По-видимому, липидная мембрана ограничивала проникновение EGCG в митохондрии [26].

Напротив, EGCG восстанавливал активность комплексов I, II и IV дыхательной ЭТЦ, нарушенную цисплатиной в клетках почек мышей. Это объясняют его антиоксидантным действием [27]. EGCG в концентрации 10 мМ ускорял дыхание и повышал активность цитохром *c*-оксидазы в нейронах и астроцитах человека [28]. В клетках костной ткани человека EGCG стимулировал дыхание [29].

Эффект EGCG на дыхание может быть обусловлен подавлением гликолиза. По данным литературы, EGCG снижает активность

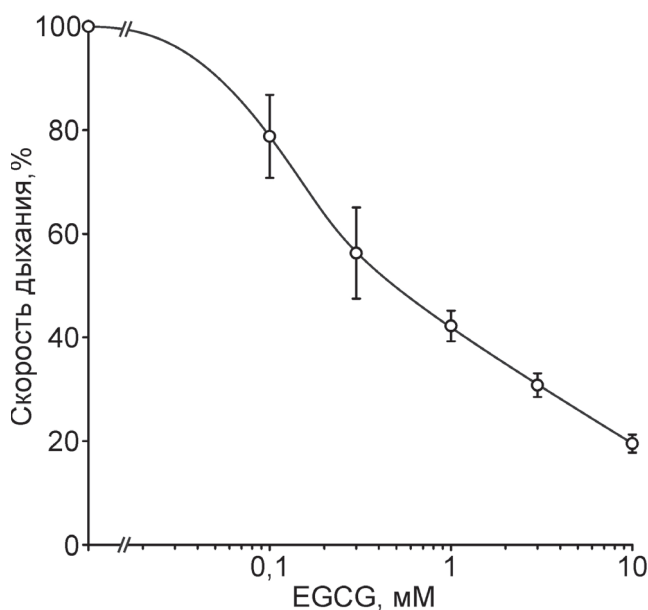


Рис. 4. Действие EGCG на дыхание в высечках листьев (ВЛ) гороха. Среда инкубации – буфер 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$ (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 . За 100% принята исходная скорость дыхания ВЛ (без добавок), она составляла 70 ± 15 мкмоль $\text{O}_2/\text{ч}$ на 1 г сырой массы

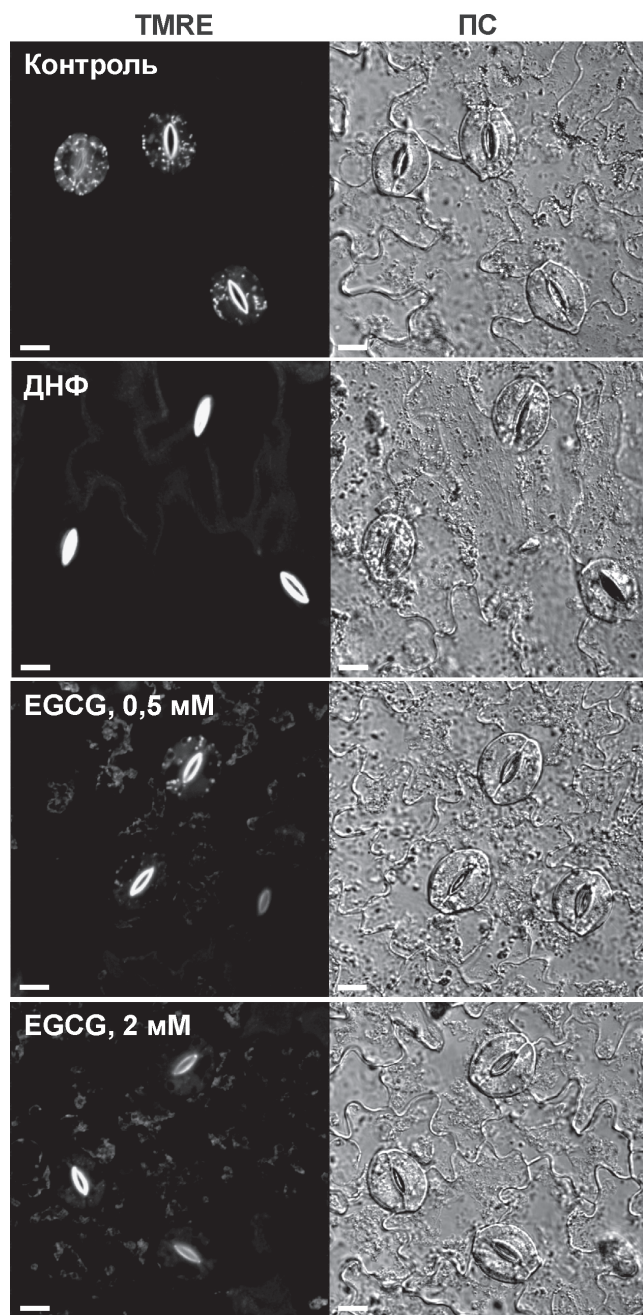


Рис. 5. Действие 2,4-динитрофенола (ДНФ) и EGCG на накопление TMRE в митохондриях устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха. Пленки эпидермиса в дистиллированной воде без добавок (контроль), с 0,5 мМ ДНФ или EGCG окрашивали 0,5 мкМ TMRE 30 мин. Масштабная линейка — 10 мкм. Обозначения: TMRE — флуоресценция TMRE, ПС — изображение в проходящем свете

фосфоглицератмутаза [30]. Причем EGCG идентифицирован как наиболее эффективный из известных ингибиторов фосфоглицератмутаза *in vitro* — IC_{50} около 0,5 мкМ. *In vivo* его действующие концентрации возрастали на 2–3 порядка, вероятно, из-за низкой проницаемости мембран для EGCG [30]. EGCG лучше растворяется в DMSO и этаноле, чем

в воде. В клетках EGCG распределен следующим образом: в цитоплазме его 85% (поэтому немембранные ферменты гликолиза для него доступны), в плазматической мембране — около 2%, а остальное — во фракции внутриклеточных мембран [31].

На рис. 5 изображены замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) в эпидермисе, изолированном из листа гороха. Они окружены основными клетками эпидермиса (см. изображение в проходящем свете). Эпидермис инкубировали с флуоресцирующим TMRE, который аккумулируется в митохондриях устьичных клеток (митохондрии эпидермальных клеток не видны, так как они находятся в другой фокальной плоскости). Протонофорный разобщитель 2,4-динитрофенол препятствовал накоплению TMRE в митохондриях. Сходным эффектом обладал EGCG в концентрации 2 мМ. Обработка 0,5 мМ EGCG подавляла накопление TMRE в митохондриях устьичных клеток лишь частично (рис. 5).

Прекращение аккумуляции TMRE в митохондриях, вызванное EGCG (рис. 5), может быть связано с торможением дыхания (рис. 4). Альтернативное объяснение — EGCG, подобно 2,4-динитрофенолу, проявляет свойства разобщителя. Показано, что EGCG может разобщать окислительное фосфорилирование в митохондриях гепатоцитов крысы [32]. Полифенолы, к которым относится и EGCG, обладают свойствами слабых протонофорных разобщителей [33].

Исследовали действие EGCG на фотосинтетический транспорт электронов в высечках листьев гороха в среде инкубации с pH 6,0. В темноте происходит поглощение O_2 в результате дыхания (рис. 6). Феррицианид и *n*-бензохинон — акцепторы электронов. *n*-Бензохинон проходит через липидные мембраны, восстанавливая феррицианид снаружи клетки и окисляя в хлоропластах пластохинол, а также редокс-центры фотосистемы II и b_6f -цитохромного комплекса, которые восстанавливают пластохинон. После включения света на фоне добавленных акцепторов электронов происходит выделение O_2 , которое подавляется добавкой 1 мМ EGCG (рис. 6, а). Последующее добавление EGCG в концентрации 2 мМ полностью прекращает фотосинтетическое выделение O_2 . После этого выключение света не оказывает эффекта.

На рис. 6, б на свету осуществляется транспорт электронов от H_2O (с выделением кислорода) через редокс-центры фотосистемы II на кремнемолибдат. Диурон, ингибитор переноса электронов с Q_A на Q_B , лишь частично

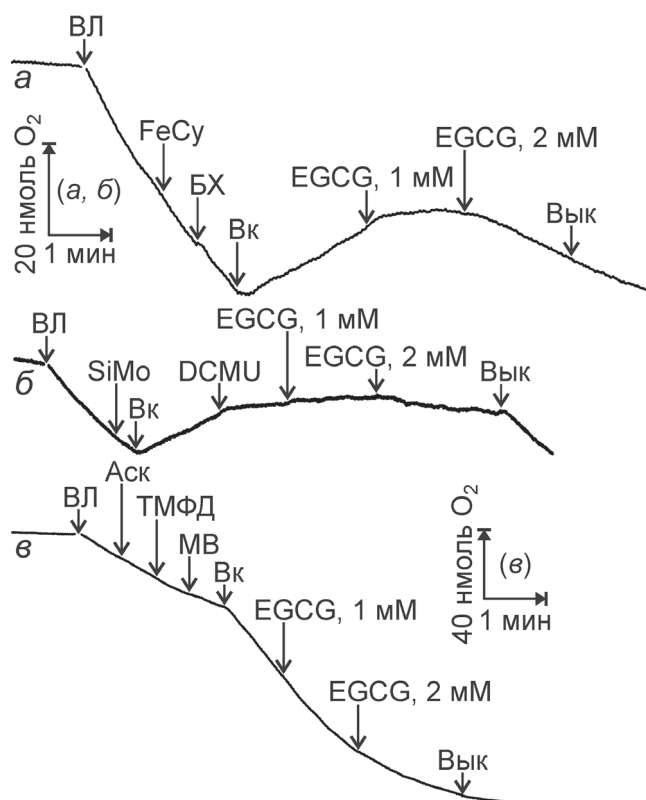


Рис. 6. Действие EGCG на выделение O_2 при переносе электронов от H_2O на n -бензохинон (БХ) и феррицианид (FeCu) (а) или на кремнемолибдат (SiMo) в фотосистеме II (б) и на поглощение O_2 при переносе электронов от аскорбата (Аск) и N,N,N',N'-тетраметил- n -фенилендиамин (ТМФД) на метилвиологен (МВ) в фотосистеме I (в) в высечках листьев (ВЛ) гороха на свету. Среда инкубации — буфер 50 мМ KH_2PO_4 —NaOH (pH 6,0) с 1 мМ $MgCl_2$. Добавки: 20 мкг ВЛ; 1 мМ FeCu; 0,1 мМ БХ; EGCG; 0,2 мМ SiMo; 10 мкМ диурина (DCMU); 1 мМ Аск; 0,1 мМ ТМФД; 1 мМ МВ. Вк и Вык — включение и выключение света

подавляет выделение O_2 , поскольку кремнемолибдат восстанавливается преимущественно Q_A [34]. На этом участке ЭТЦ хлоропластов EGCG менее эффективен, транспорт электронов ингибируется не полностью: 1 мМ EGCG не оказывает эффекта; добавка еще 2 мМ EGCG меняет медленное выделение O_2 на его медленное поглощение; выключение света значительно ускоряет поглощение O_2 (рис. 6, б).

На рис. 6, в освещение включает следующий путь переноса электронов: аскорбат $\rightarrow$ N,N,N',N'-тетраметил- n -фенилендиамин (ТМФД, $E_0' = 0,26$ В) $\rightarrow$ P700 ($E_0' = 0,45$ В) $\rightarrow$ редокс-центры фотосистемы I $\rightarrow$ Fe_4S_4 -центр $F_B \rightarrow$ метилвиологен $\rightarrow O_2$. ТМФД может также восстанавливать пластоцианин ($E_0' = 0,37$ В), но не взаимодействует с b_6f -цитохромным комплексом [35, 36]. Кислород расходуется на образование O_2^- , поэтому включение света усиливает его поглощение. Эф-

фект EGCG в концентрации 1 мМ незначителен. Последующая добавка 2 мМ EGCG ингибирует поглощение кислорода (рис. 6, в).

Полученные результаты (рис. 6) демонстрируют, что EGCG подавляет перенос электронов в фотосинтетической ЭТЦ хлоропластов. В мировой научной литературе нет сведений о его действии на фотосинтез у растений, однако показано, что EGCG ингибирует реакции фотосинтеза у цианобактерии *Microcystis aeruginosa* [37]. Эффективность EGCG менялась в зависимости от задействованных участков ЭТЦ: фотосистема II $\rightarrow$ пул пластохинона $\rightarrow b_6f$ -цитохромный комплекс (n -бензохинон) $>$ фотосистема I (ТМФД и метилвиологен) $>$ фотосистема II (кремнемолибдат).

Величины E_0' допускают, что EGCG с $E_0' 0,1$ – $0,15$ В [38] может восстанавливать FeS-белок Риске (0,3–0,32 В) и цитохром f (0,35–0,38 В) в b_6f -цитохромном комплексе [39] и окислять FeS-центры (от $-0,7$ до $-0,55$ В) фотосистемы I. Менее вероятно восстановление им хлоропластного пластохинона (от $-0,13$ до $0,1$ В), особенно хинонов в фотосистеме II: Q_A ($-0,13$ В) и Q_B ($-0,01$ В). Возможно, ингибирующее действие EGCG на фотосинтез обусловлено редокс-реакциями с компонентами фотосинтетической ЭТЦ. Это предположение согласуется с полученными результатами: большей эффективностью EGCG в подавлении переноса электронов в b_6f -цитохромном комплексе и фотосистеме I и меньшим эффектом — в отношении фотосистемы II (рис. 6).

В эпидермисе из листьев гороха определяли содержание АФК по флуоресценции DCF, образующегося из нефлуоресцирующего DCFH-DA. Добавка NADH вызывала образование АФК, усиливая выход флуоресценции DCF (рис. 7). Эта генерация АФК, очевидно, обусловлена пероксидазно-оксидазной активностью в апопласте, поскольку клеточная мембрана непроницаема для NADH. Антиоксидант пропилгаллат и KCN, ингибитор гемовых ферментов (в том числе пероксидаз), снижали выход флуоресценции (рис. 7, а). EGCG проявлял антиоксидантные свойства: в концентрации 20 мкМ EGCG снижал скорость образования DCF на 30%, а при добавке 2 мМ — на 70% (рис. 7, б).

KCN, индуктор ПКС, вызывал гибель устьичных клеток гороха, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер (рис. 8, а). На свету KCN действовал эффективнее, чем в темноте — хлоропласты вносят вклад в ПКС у растений [19]. EGCG в концентрации 1 мкМ не влиял на разрушение ядер устьичных клеток. EGCG в концентрации от 10 мкМ

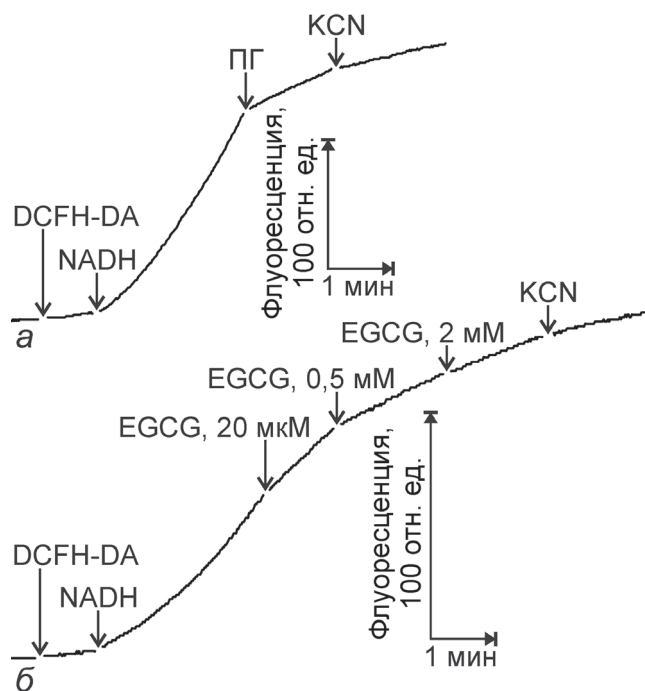


Рис. 7. Действие EGCG на скорость образования флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в пленке эпидермиса из листа гороха. Пленку эпидермиса помещали в кювету со средой инкубации — буфер 50 мМ KH_2PO_4 –NaOH (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 . Добавки: 20 мкМ DCFH-DA; 1 мМ NADH; 0,5 мМ пропилгаллата (ПГ); 2,5 мМ KCN; EGCG

до 10 мМ снижал KCN-индуцированное разрушение ядер в темноте и на свету (рис. 8, а). Этот эффект EGCG вряд ли можно объяснить его действием на пероксидазу или на дыхание и фотосинтез, поскольку KCN сам по себе является эффективным ингибитором пероксидазы, а также дыхания и фотосинтеза. Однако гибель устьичных клеток, вызванная обработкой KCN, чувствительна к антиоксидантам [19], а EGCG может обладать антиоксидантной активностью не только в сочетании с пероксидазой, но и за счет остатков галловой кислоты в своем составе [24].

Подавление разрушения ядер устьичных клеток, вызванное KCN, может происходить в результате переключения типа клеточной гибели с ПКС на непрототипический некроз, например, при использовании детергентов или увеличения концентрации индукторов ПКС [40]. Поэтому было испытано действие EGCG на барьерную функцию плазматической мембраны. EGCG в концентрации 0,5–3 мМ не оказывал эффекта, а в концентрации 10 мМ увеличивал проницаемость плазматической мембраны для PI (рис. 8, б). Таким образом, снижение CN^- -индуцированного разрушения ядер в результате обработки

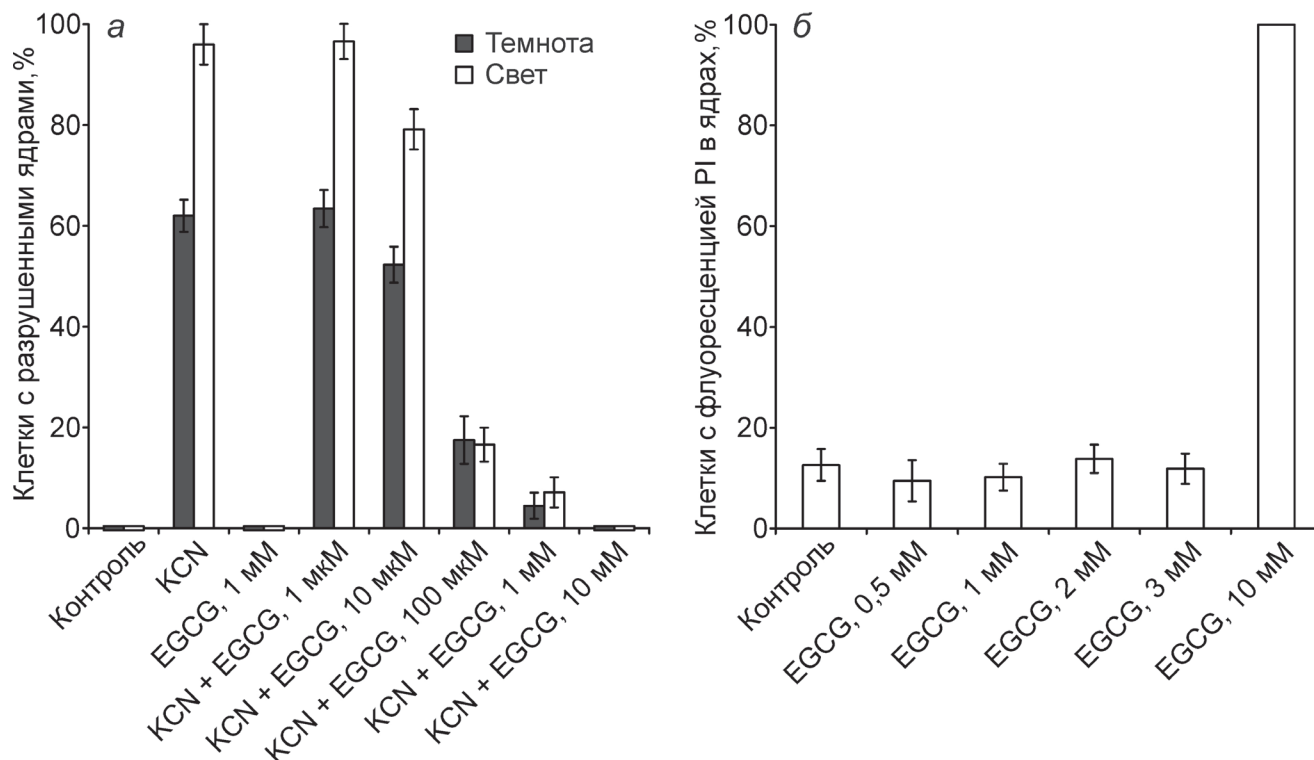


Рис. 8. Действие EGCG на KCN-индуцированное разрушение ядер (а) и проницаемость для PI плазматической мембраны (б) устьичных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. а — К пленкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN и EGCG; инкубировали 20 ч в темноте или на свету; окрашивали гематоксилином и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. б — К пленкам эпидермиса добавляли EGCG; инкубировали 2 ч в темноте; окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах

EGCG (рис. 8, а) может быть связано с повреждением плазматической мембраны клеток лишь при высокой его концентрации (10 мМ), но не в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ.

Повреждение клеточной мембраны, диссипацию $\Delta\psi$ в митохондриях, подавление дыхания и фотосинтеза можно объяснить прооксидантным действием EGCG. Внутри клеток, при слабощелочных pH, EGCG окисляется с образованием H_2O_2 . Наиболее высокую скорость окисления EGCG следует ожидать в строме хлоропластов на свету, где pH достигает значения 8,0 [41], а также в матриксе митохондрий – pH 7,8 [25]. H_2O_2 способен изменять физико-химические свойства клеточных мембран, вызывать деполяризацию митохондриальной мембраны, приводить к перекисному окислению липидов и нарушению мембранного барьера проницаемости [42–44].

В целом, исследованы редокс-свойства EGCG в растворе и его действие на клетки растений. EGCG *in vitro* окислялся кислородом при физиологических значениях pH. Снижение pH замедляло его окисление. Окисление EGCG сопровождалось образованием O_2^- и H_2O_2 . Вместе с тем EGCG функционировал в качестве донора электронов для пероксидазы, утилизируя H_2O_2 в комбинации с пероксидазой. В работе впервые исследовано действие EGCG на энергообмен и гибель клеток растений. В клетках гороха EGCG в концентрациях 0,5–3 мМ подавлял дыхание, снижал $\Delta\psi$ в митохондриях и ингибировал транспорт электронов в фотосинтетической ЭТЦ. EGCG уменьшал образование АФК, вызванное добавкой к клеткам NADH. В концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ EGCG препятствовал ПКС, вызванной обработкой клеток KCN. В более высоких концентрациях (10 мМ) EGCG индуцировал проницаемость плазматической мембраны клеток для PI. В целом, несмотря на прооксидантные свойства EGCG, в концентрациях до 1 мМ вклю-

чительно проявляется его цитопротекторное действие.

Данные показывают, что при воздействии EGCG на клетки растений преобладает его антиоксидантный эффект. Сходное действие EGCG отмечается в большинстве исследований на животных моделях. Это соединение обладает интересными свойствами, включающими его анти- и прооксидантную активность. Предположительно, EGCG окисляется в различных клеточных компартментах с разной скоростью, зависящей от величины pH. EGCG может быть перспективным для использования в биологических исследованиях и защите растений, однако следует учитывать его ингибирующее действие на дыхание и фотосинтез, а также ограничение в использовании высоких концентраций, при которых повреждается клеточная мембрана.

Вклад авторов. В.Д. Самуилов – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи; О.В. Самуилова – обсуждение и редактирование текста статьи; Д.Б. Киселевский – проведение экспериментов и написание текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9, а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». В работе использовали оборудование, приобретенное в рамках «Программы развития Московского университета», и оборудование ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

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

1. Farhan, M. (2022) Green tea catechins: Nature's way of preventing and treating cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10713, doi: 10.3390/ijms231810713.
2. Imai, K., Suga, K., and Nakachi, K. (1997) Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Prev. Med.*, **26**, 769-775, doi: 10.1006/pmed.1997.0242.
3. Singh, B. N., Shankar, S., and Srivastava, R. K. (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1807-1821, doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.093.
4. Gan, R. Y., Li, H. B., Sui, Z. Q., and Corke, H. (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58**, 924-941, doi: 10.1080/10408398.2016.1231168.

5. Hu, J., Zhou, D., and Chen, Y. (2009) Preparation and antioxidant activity of green tea extract enriched in epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG), *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1349-1353, doi: 10.1021/jf803143n.
6. Nain, C. W., Mignolet, E., Herent, M. F., Quetin-Leclercq, J., Debier, C., Page, M. M., and Laron-delle, Y. (2022) The catechins profile of green tea extracts affects the antioxidant activity and degradation of catechins in DHA-rich oil, *Antioxidants*, **11**, 1844, doi: 10.3390/antiox11091844.
7. Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., and Bettuzzi, S. (2018) Molecular targets of epigallocatechin-gallate (EGCG): a special focus on signal transduction and cancer, *Nutrients*, **10**, 1936, doi: 10.3390/nu10121936.
8. Zhao, J., Blayney, A., Liu, X., Gandy, L., Jin, W., Yan, L., Ha, J.-H., Canning, A.J., Connelly, M., Yang, C., Liu, X., Xiao, Y., Cosgrove, M. S., Solmaz, S. R., Zhang, Y., Ban, D., Chen, J., Loh, S. N., and Wang, C. (2021) EGCG binds intrinsically disordered N-terminal domain of p53 and disrupts p53-MDM2 interaction, *Nat. Commun.*, **12**, 986, doi: 10.1038/s41467-021-21258-5.
9. Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., and Steinmann, E. (2013) Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea, *Br. J. Pharmacol.*, **168**, 1059-1073, doi: 10.1111/bph.12009.
10. Tsvetkov, V., Varizhuk, A., Kozlovskaya, L., Shtro, A., Lebedeva, O., Komissarov, A., Vedekhina, T., Manuvera, V., Zubkova, O., Eremeev, A., Shustova, E., Pozmogova, G., Lioznov, D., Ishmukhametov, A., Lazarev, V., and Lagarkova, M. (2021) EGCG as an anti-SARS-CoV-2 agent: Preventive versus therapeutic potential against original and mutant virus, *Biochimie*, **191**, 27-32, doi: 10.1016/j.biochi.2021.08.003.
11. Taylor, L. P., and Grotewold, E. (2005) Flavonoids as developmental regulators, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 317-323, doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005.
12. Treutter, D. (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis, *Plant Biol. (Stuttg)*, **7**, 581-591, doi: 10.1055/s-2005-873009.
13. Hong, G., Wang, J., Hochstetter, D., Gao, Y., Xu, P., and Wang, Y. (2015) Epigallocatechin-3-gallate functions as a physiological regulator by modulating the jasmonic acid pathway, *Physiol. Plant.*, **153**, 432-439, doi: 10.1111/pp1.12256.
14. Wei, Y., Chen, P., Ling, T., Wang, Y., Dong, R., Zhang, C., Zhang, L., Han, M., Wang, D., Wan, X., and Zhang, J. (2016) Certain (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) auto-oxidation products (EAOPs) retain the cytotoxic activities of EGCG, *Food Chem.*, **204**, 218-226, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.134.
15. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **65**, 45-80, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
16. Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., and Kang, D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells*, **29**, 539-549, doi: 10.1007/s10059-010-0082-3.
17. 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.
18. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennsson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
19. 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.
20. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry*, **13**, 795-808, doi: 10.1002/cyto.990130802.
21. Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
22. Yokota, K., and Yamazaki, I. (1977) Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase, *Biochemistry*, **16**, 1913-1920, doi: 10.1021/bi00628a024.
23. Votyakova, T. V., and Reynolds, I. J. (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **431**, 138-144, doi: 10.1016/j.abb.2004.07.025.
24. Kiselevsky, D. B., Il'ina, A. V., Lunkov, A. P., Varlamov, V. P., Samuilov, V. D. (2022) Investigation of the antioxidant properties of the quaternized chitosan modified with a gallic acid residue using peroxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 141-149, doi: 10.1134/S0006297922020067.
25. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., and Rugolo, M. (2005) pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 799-804, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.105.
26. Weng, Z., Zhou, P., Salminen, W. F., Yang, X., Harrill, A. H., Cao, Z., Mattes, W. B., Mendrick, D. L., and Shi, Q. (2014) Green tea epigallocatechin gallate binds to and inhibits respiratory complexes in swelling but not normal rat hepatic mitochondria, *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **443**, 1097-1104, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.110.
27. Pan, H., Chen, J., Shen, K., Wang, X., Wang, P., Fu, G., Meng, H., Wang, Y., and Jin, B. (2015) Mitochondrial modulation by epigallocatechin 3-gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF- κ B in mice, *PLoS One*, **10**, e0124775, doi: 10.1371/journal.pone.0124775.
 28. Castellano-González, G., Pichaud, N., Ballard, J. W., Bessede, A., Marcal, H., and Guillemin, G. J. (2016) Epigallocatechin-3-gallate induces oxidative phosphorylation by activating cytochrome *c* oxidase in human cultured neurons and astrocytes, *Oncotarget*, **7**, 7426-7440, doi: 10.18632/oncotarget.6863.
 29. Pal, S., Porwal, K., Rajak, S., Sinha, R. A., and Chattopadhyay, N. (2020) Selective dietary polyphenols induce differentiation of human osteoblasts by adiponectin receptor 1-mediated reprogramming of mitochondrial energy metabolism, *Biomed. Pharmacother.*, **127**, 110207, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110207.
 30. Li, X., Tang, S., Wang, Q.-Q., Leung, E. L.-H., Jin, H., Huang, Y., Liu, J., Geng, M., Huang, M., Yuan, S., Yao, X.-J., and Ding, J. (2017) Identification of epigallocatechin-3-gallate as an inhibitor of phosphoglycerate mutase 1, *Front. Pharmacol.*, **8**, 325, doi: 10.3389/fphar.2017.00325.
 31. Weber, A. A., Neuhaus, T., Skach, R. A., Hescheler, J., Ahn, H. Y., Schrör, K., Ko, Y., and Sachinidis, A. (2004) Mechanisms of the inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate on platelet-derived growth factor-BB-induced cell signaling and mitogenesis, *FASEB J.*, **18**, 128-130, doi: 10.1096/fj.03-0007fje.
 32. Kucera, O., Mezera, V., Moravcova, A., Endlicher, R., Lotkova, H., Drahotka, Z., and Cervinkova, Z. (2015) *In vitro* toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 476180, doi: 10.1155/2015/476180.
 33. Stevens, J. F., Revel, J. S., and Maier, C. S. (2018) Mitochondria-centric review of polyphenol bioactivity in cancer models, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1589-1611, doi: 10.1089/ars.2017.7404.
 34. Schansker, G., and van Rensen, J. J. (1993) Characterization of the complex interaction between the electron acceptor silicomolybdate and Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **37**, 165-175, doi: 10.1007/BF02187475.
 35. Petrova, A., Mamedov, M., Ivanov, B., Semenov, A., and Kozuleva, M. (2018) Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes, *Photosynth. Res.*, **137**, 421-429, doi: 10.1007/s11120-018-0514-z.
 36. Calzadilla, P. I., Zhan, J., Sétif, P., Lemaire, C., Solymosi, D., Battchikova, N., Wang, Q., and Kirilovsky, D. (2019) The cytochrome *b₆f* complex is not involved in cyanobacterial state transitions, *Plant Cell*, **31**, 911-931, doi: 10.1105/tpc.18.00916.
 37. Lu, Y., Wang, J., Yu, Y., Shi, L., and Kong, F. (2014) Changes in the physiology and gene expression of *Microcystis aeruginosa* under EGCG stress, *Chemosphere*, **117**, 164-169, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.040.
 38. Baranowska, M., Suliborska, K., Chrzanowski, W., Kusznierevich, B., Namieśnik, J., and Bartoszek, A. (2018) The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control, *Redox Biol.*, **17**, 355-366, doi: 10.1016/j.redox.2018.05.005.
 39. Saif Hasan, S., Yamashita, E., and Cramer, W. A. (2013) Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome *b₆f*-lipidic charge transfer complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1295-1308, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.03.002.
 40. Киселевский Д. Б., Самуилов В. Д. (2019) Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидия и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектролитов и детергентов, *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*, **74**, 188-194, doi: 10.3103/S0096392519030052.
 41. Trinh, M. D. L., and Masuda, S. (2022) Chloroplast pH homeostasis for the regulation of photosynthesis, *Front. Plant Sci.*, **13**, 919896, doi: 10.3389/fpls.2022.919896.
 42. Kunitomo, M., Inoue, K., and Nojima, S. (1981) Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 169-178, doi: 10.1016/0005-2736(81)90284-4.
 43. Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2008) H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1141-1147, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.12.008.
 44. Garrido-Bazán, V., and Aguirre, J. (2022) H₂O₂ induces calcium and ERMES complex-dependent mitochondrial constriction and division as well as mitochondrial outer membrane remodeling in *Aspergillus nidulans*, *J. Fungi*, **8**, 829, doi: 10.3390/jof8080829.

**pH-DEPENDENT REDOX PROPERTIES
OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) AND ITS EFFECT
ON RESPIRATION, PHOTOSYNTHESIS AND CELL DEATH IN PEA**

D. B. Kiselevsky^{1*}, O. V. Samuilova², and V. D. Samuilov¹

¹ *Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: dkiselevs@mail.ru*

² *Department of Biological Chemistry, Institute of Biodesign and Modeling of Complex Systems,
Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

The redox properties of the green tea component epigallocatechin gallate (EGCG) *in vitro* were studied and its effect on plant (pea) cells was tested. EGCG exhibited both pro- and antioxidant properties. In solutions, EGCG was oxidized by oxygen at physiological (slightly alkaline) pH values. Lowering the pH slowed down this process. Oxidation of EGCG was accompanied by the formation of O_2^- and H_2O_2 . In addition, EGCG functioned as an electron donor for peroxidase and, in combination with it, utilized H_2O_2 . Exposure of EGCG to pea cells (leaf cuts or epidermis) suppressed respiration, reduced the transmembrane electric potential difference ($\Delta\psi$) in mitochondria, and inhibited electron transfer in the photosynthetic electron transfer chain. Among the sites of the photosynthetic redox chain, Photosystem II was the least sensitive to the action of EGCG. EGCG reduced the rate of formation of reactive oxygen species in the epidermis, which was induced by NADH treatment and was registered using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. *In vivo*, EGCG at concentrations from 10 μ M to 1 mM suppressed KCN-induced death of guard cells in the epidermis, which was determined from the destruction of cell nuclei. EGCG at a concentration of 10 mM disrupted the barrier function of the guard cell plasma membrane, increasing its permeability to propidium iodide.

Keywords: EGCG, peroxidase, reactive oxygen species, cell death, pea