

УДК 577.355.2

## ДЕЙСТВИЕ КАТИОННОГО ПЛАСТОХИНОНА SkQ1 НА ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫЕ РЕАКЦИИ В ХЛОРОПЛАСТАХ И МИТОХОНДРИЯХ ИЗ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА\*

© 2015 В.Д. Самуилов\*\*, Д.Б. Киселевский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, 119991; факс: +7(495)939-3807,  
электронная почта: vdsamuilov@mail.ru

Поступила в редакцию 14.08.14  
После доработки 04.12.14

Пластохинон, связанный с проникающим через мембраны катионом децилтрифенилфосфония (SkQ1), в наномолярных концентрациях подавляет образование  $H_2O_2$  в клетках эпидермиса из листьев проростков гороха, регистрируемое по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Фотосинтетический перенос электронов в хлоропластах, выделенных из листьев гороха, подавляется SkQ1 в микромолярных концентрациях: перенос электронов в хлоропластах при функционировании фотосистем II или I (с кремнемолибдатом или метилвиологеном в качестве акцепторов электронов соответственно) более чувствителен к SkQ1, чем при функционировании фотосистем II + I (с феррицианидом или *n*-бензохиноном в качестве акцепторов электронов). SkQ1, восстановленный боргидридом, окисляется феррицианидом, *n*-бензохиноном и, в меньшей мере, кремнемолибдатом, но не метилвиологеном. SkQ1 не эффективен как акцептор электронов, поддерживающий выделение  $O_2$  из воды в освещенных хлоропластах. Данные о подавлении фотосинтетического выделения или поглощения  $O_2$  показывают, что SkQ1, подобно феназинметосульфату, вызывает переход редокс-цепи хлоропластов из режима нециклического переноса электронов в циклический режим без выделения  $O_2$ . Окисление NADH или сукцината в митохондриях из корней гороха стимулируется SkQ1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** программируемая клеточная смерть, митохондриально-направленные хиноны, SkQ1, перенос электронов, торможение в хлоропластах, стимуляция в митохондриях.

Программируемая клеточная смерть (ПКС) – физиологический процесс саморазрушения клетки. Митохондрии играют важную роль в ПКС как поставщики активных форм кислорода (АФК) и ряда апоптогенных факторов, включая цитохром *c* и флавопротеин AIF [1]. У растений в ПКС участвуют хлоропласты [2, 3], обеспечивающие процесс АФК и (предположительно) активирующие специфическую протеинкиназу, регулируемую редокс-состоянием хинонов.

Генерируя мембранный потенциал ( $\Delta\psi$ ) со знаком «минус» в матриксе, митохондрии аккумулируют катионы, проникающие через мембраны, в частности, катионы метилтрифенилфосфо-

ния [4]. Митохондрии избирательно поглощают MitoQ – убихинон, ковалентно связанный с проникающим катионом децилтрифенилфосфония (ДТФФ<sup>+</sup>) [5]. Взаимодействуя с дыхательной цепью митохондрий, MitoQ проявляет себя как эффективный антиоксидант, который предотвращает перекисное окисление мембранных липидов и обладает антиапоптозным действием [5–7].

Синтезирован новый ряд антиоксидантов, составленных из пластохинона, проникающего катиона и деканового или пентанового линкера [8], – 10-(6'-пластохинонил)-ДТФФ<sup>+</sup> (SkQ1), 10-(пластохинонил)децилпроламином 19 (SkQR1) и 10-(6'-метилпластохинонил)-ДТФФ<sup>+</sup> (SkQ3).

Принятые сокращения: Аск – аскорбат; АФК – активные формы кислорода; БХ – *n*-бензохинон; ДТФФ<sup>+</sup> – катион децилтрифенилфосфония; МВ – метилвиологен; ПКС – программируемая клеточная смерть; СГ – салицилгидроксамат; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; УК – устьичные клетки; ФМС – феназинметосульфат; ЭК – эпидермальные клетки; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; FeCy – феррицианид; MitoQ – 10-(6'-убихинонил)децилтрифенилфосфоний; SiMo – кремнемолибдат; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; SkQ3 – 10-(6'-метилпластохинонил)децилтрифенилфосфоний; SkQR1 – 10-(пластохинонил)децилпроламин;  $\Delta\psi$  – трансмембранная разность электрических потенциалов.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-231, 22.02.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

Они проявляют антиоксидантные свойства в пико- и наномолярных концентрациях, а в более высоких, микромолярных, концентрациях являются прооксидантами. Антиоксидантная активность меняется в ряду  $SkQ1 = SkQR1 > SkQ3 > MitoQ$ . Катионные хиноны восстанавливаются комплексами I и II дыхательной цепи митохондрий, т.е. являются регенерируемыми антиоксидантами многократного действия [8].

Цианид индуцирует гибель клеток в эпидермисе из листьев растений, регистрируемую по разрушению клеточных ядер. Эпидермис – монослой из замыкающих клеток устьиц (устьичных клеток – УК), содержащих митохондрии и хлоропласты, и основных клеток эпидермиса (эпидермальных клеток – ЭК), содержащих только митохондрии. Разрушение ядер УК и ЭК, вызванное  $CN^-$  в качестве индуктора ПКС, предотвращается катионными хинонами [9]. Перенос электронов в освещенных тилакоидах хлоропластов генерирует  $\Delta\psi$  со знаком «плюс» внутри, поэтому хиноны, связанные с проникающими катионами, не будут накапливаться в энергизованных хлоропластах, напротив, будут выбрасываться из них. Действительно, защитное действие ДТФФ<sup>+</sup>-производных хинонов отсутствует при освещении [9].

Будут ли катионные хиноны оказывать действие на хлоропласты? Цель настоящей работы – испытать влияние пластохинона, ковалентно связанного с ДТФФ<sup>+</sup> (SkQ1), на перенос электронов в хлоропластах из листьев и митохондрий из корней проростков гороха.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа) выращивали 7–15 сут при периодическом освещении светом металлогалогеновой лампы ДРиЗ (250 Вт) интенсивностью  $\sim 100 \mu E \cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$  (свет – 16 ч, темнота – 8 ч) при 20–24°.

Хлоропласты выделяли, как описано ранее [10], из листьев проростков растиранием в фарфоровой ступке в среде, содержащей 50 мМ Трицин-КОН, 35 мМ NaCl и 0,4 М сахарозы, рН 7,8, отмывали и суспендировали в той же среде. Митохондрии выделяли, как описано [11], из корней проростков гороха, растирали их в ступке, затем отмывали и хранили, как и хлоропласты, в среде того же состава. Хлоропласты и митохондрии хранили при 4° и использовали в течение 3–4 ч после выделения. Содержание хлорофилла в хлоропластах измеряли методом Арнона [12], содержание белка в митохондриях определяли с помощью бицинхониновой кислоты и сульфата меди [13].

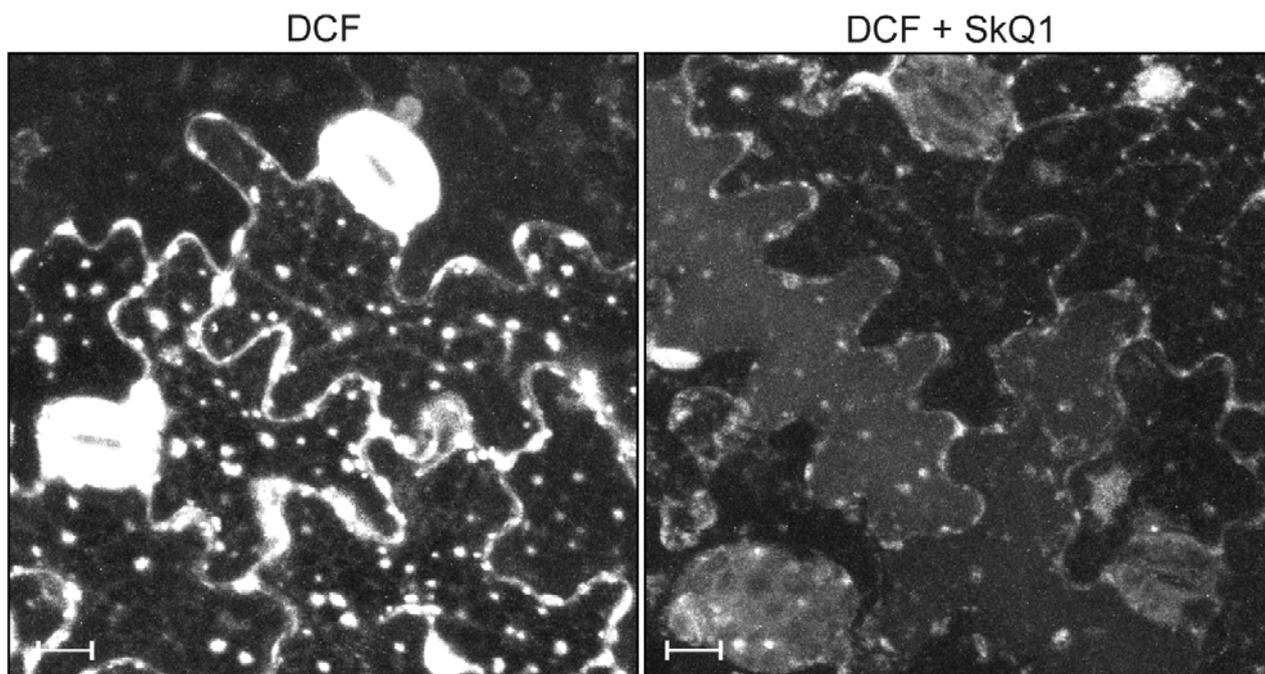
Образование АФК в клетках из листьев проростков гороха оценивали по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF). Флуоресценцию DCF возбуждали лучом лазера при 488 нм и регистрировали при 500–530 нм с помощью микроскопа Axiovert 200M с конфокальной приставкой LSM 510 Meta («Carl Zeiss», Германия).

Светозависимое выделение  $O_2$  хлоропластами и поглощение  $O_2$  митохондриями гороха измеряли полярографически с закрытым платиновым электродом. Для освещения хлоропластов использовали сфокусированный свет галогеновой лампы (250 Вт) с интенсивностью  $\sim 11,4 \text{ мЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рис. 1 показывает образование  $H_2O_2$  в УК и ЭК листьев гороха, регистрируемое по флуоресценции DCF. Нефлуоресцирующий 2',7'-дихлорфлуоресцин (DCFH) в клетках окисляется до флуоресцирующего DCF посредством  $H_2O_2$  ферментативно (с участием пероксидазы) или неферментативно (в присутствии  $H_2O_2 + Fe^{2+}$ ) [14]. DCFH окисляется также  $OH^\cdot$ ,  $CO_2^-$  и медленнее  $NO_2^\cdot$ , но не  $O_2^-$  [15]. В УК DCF преимущественно флуоресцирует в хлоропластах, в ЭК – в сферических структурах, представляющих собой митохондрии [16], и вдоль плазматических мембран, содержащих генерирующую АФК NADPH-оксидазу [17]. SkQ1 тушит флуоресценцию DCF в УК и ЭК (рис. 1), предотвращая образование  $H_2O_2$ .

Для исследования действия SkQ1 на нециклический перенос электронов в хлоропластах были испытаны различные участки фотосинтетической редокс-цепи. Выделение  $O_2$  хлоропластами с кремнемолибдатом ( $SiMo: H_4SiO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot H_2O$ ) в качестве акцептора электронов осуществляется фотосистемой II, устойчивой к диурону, ингибитору переноса электронов на уровне вторичного пластохинона  $Q_B$  фотосистемы II: SiMo вытесняет диурон с участка его связывания и восстанавливается первичным пластохиноном  $Q_A$  фотосистемы II [18]. Фотосистема I была задействована с помощью электрон-донорной пары аскорбата (Аск) и N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), взаимодействующего с  $b_6f$ -цитохромным комплексом, пластоцианином и комплексом реакционного центра фотосистемы I. В качестве акцептора электронов был использован метилвиологен (МВ), который, восстанавливаясь преимущественно FeS-центром  $F_B$  [19] редокс-цепи фотосистемы I, самопроизвольно окисляется  $O_2$ . В итоге перенос электронов от пары ТМФД + ас-



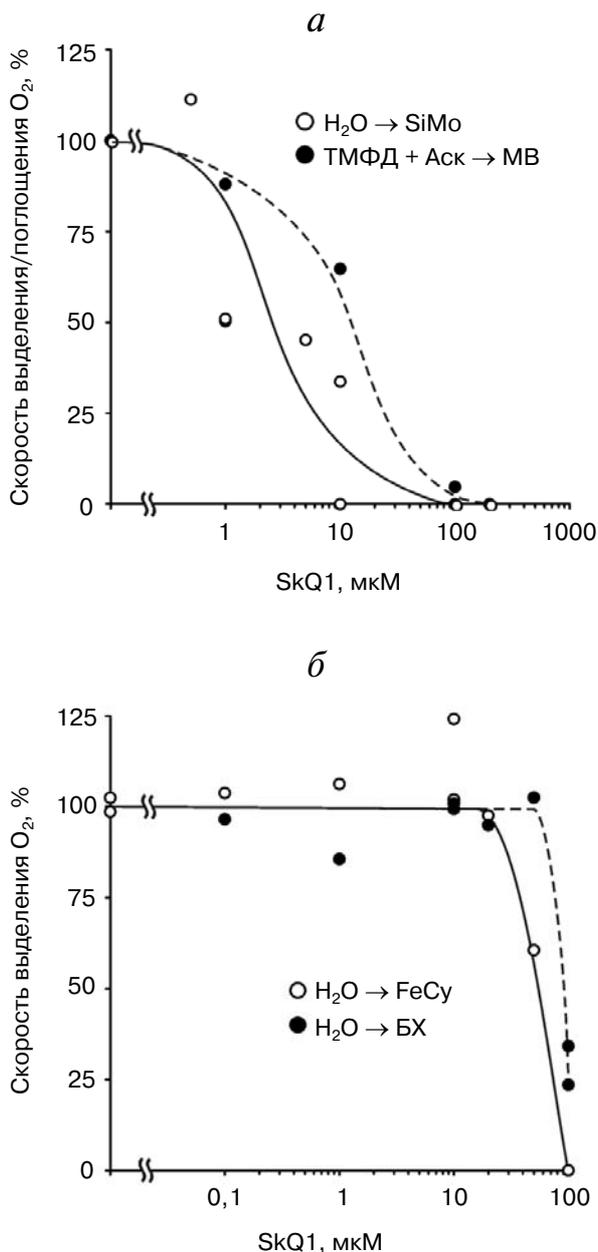
**Рис. 1.** Действие SkQ1 на выход флуоресценции DCF в УК и ЭК листьев гороха. К кусочкам листьев добавляли 100 нМ SkQ1, инкубировали 1 ч, окрашивали 20 мкМ диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцина в течение 20 мин; флуоресценцию DCF регистрировали у края кусочков листовой пластинки. На изображениях – суммарная картина (максимальная проекция) флуоресценции DCF с 20 оптических срезов, удаленных один от другого на 1 мкм. Масштабная линейка – 10 мкм. Флуоресценцию DCF возбуждали светом с длиной волны 488 нм и регистрировали при 500–530 нм

корбат на метилвиологен и далее на  $O_2$  приводит к поглощению  $O_2$  освещенными хлоропластами. SkQ1 подавляет нециклический перенос электронов как в фотосистеме II, так и в фотосистеме I (рис. 2, а), полумаксимальная концентрация ( $I_{50}$ ) для SkQ1 составляет около 2–3 и 10–20 мкМ соответственно.

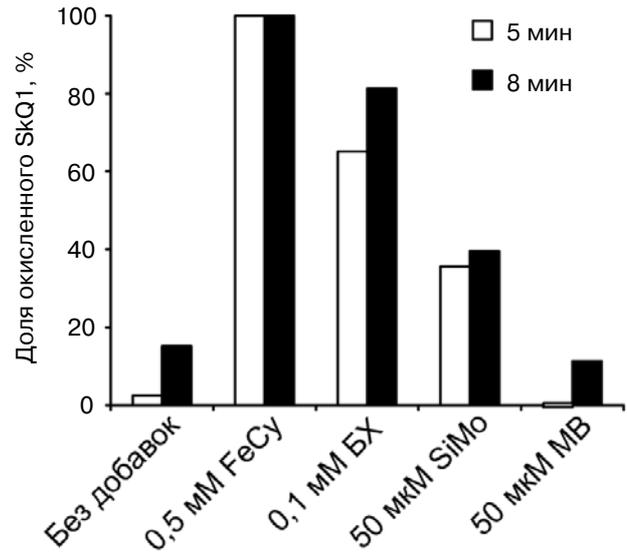
Фотосинтетическое выделение  $O_2$  хлоропластами с феррицианидом (FeCy) или *n*-бензохиноном (БХ) устойчиво к SkQ1 вплоть до концентрации 20 и 50 мкМ соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации SkQ1 подавляет выделение  $O_2$  с  $I_{50}$  около 50–60 и 90–100 мкМ соответственно (рис. 2, б). Различия в чувствительности переноса электронов с испытанными парами акцепторов электронов к SkQ1, по-видимому, связаны не только с их редокс-свойствами.

Так, SkQ1, восстановленный боргидридом  $NaBH_4$ , окисляется феррицианидом, *n*-бензохиноном и в меньшей степени SiMo, но не метилвиологеном (рис. 3). Более низкая скорость окисления кремнемолибдатом может быть обусловлена его структурными особенностями. Вариант с метилвиологеном сходен с самопроизвольным аэробным окислением SkQ1.

SkQ1 как акцептор электронов, конкурируя с SiMo и метилвиологеном, ингибирует нециклический перенос электронов и, по-видимому, переключает его на циклический путь, восстанавливаясь пластохинонами  $Q_B$ ,  $Q_P$ ,  $Q_Z$  и  $Q_C$  комплекса P680 и *b<sub>6</sub>f*-цитохромного комплекса, филохиноном и FeS-центрами комплекса P700 и окисляясь компонентами  $(Mn)_4$ , Тир комплексов реакционных центров фотосистемы II, *b<sub>6</sub>f*-комплексом, пластоцианином и даже реакционным центром P700 (рис. 4). Такое истолкование окислительно-восстановительного взаимодействия SkQ1 с компонентами электрон-транспортной цепи хлоропластов, конечно, не является однозначным, требуются дальнейшие исследования. Величина  $E'_0$  SkQ1, измеренная в стандартных условиях, здесь не может быть применена, поскольку она будет зависеть от взаимодействия с компонентами мембран: один и тот же пластохинон, как показывает рис. 4, выполняет функции  $Q_A$ ,  $Q_B$ ,  $Q_P$ ,  $Q_Z$  и  $Q_C$ . Окисляясь феррицианидом или *n*-бензохиноном, SkQ1 ингибирует фотосинтетическое выделение  $O_2$  лишь при высоких концентрациях, переключая нециклический перенос электронов в режим циклического. Феназинметосульфат (ФМС), эффек-



**Рис. 2.** Действие SkQ1. *а* – На выделение  $O_2$  при переносе электронов от  $H_2O$  на кремнемолибдат (SiMo) и поглощение  $O_2$  при переносе электронов от аскорбата (Аск) + N,N,N',N'-тетраметил-*л*-фенилендиамин (ТМФД) на метилвиологен (МВ); *б* – на выделение  $O_2$  при переносе электронов от  $H_2O$  на феррицианид (FeCy) или *л*-бензохинон (БХ) в освещенных хлоропластах из листьев гороха. Перед измерениями хлоропласты преинкубировали с SkQ1 в концентрациях, отмеченных на рис., в течение 1–2 ч. В оксиметрическую ячейку (1,5 мл) вводили хлоропласты с содержанием хлорофилла 10–20 мкг/мл. Среда инкубации хлоропластов содержала 50 мМ Трицин-КОН, 35 мМ NaCl и 0,4 М сахарозы (рН 7,8). Добавки: 0,1 мМ SiMo, 0,1 мМ ТМФД, 1 мМ Аск, 1 мМ МВ, 2 мМ FeCy, 0,1 мМ БХ. 100%-ные скорости выделение  $O_2$  с SiMo, FeCy и БХ составляли 35–50 и поглощения  $O_2$  с МВ – 200–350 мкмоль  $O_2$ /ч на 1 мг хлорофилла

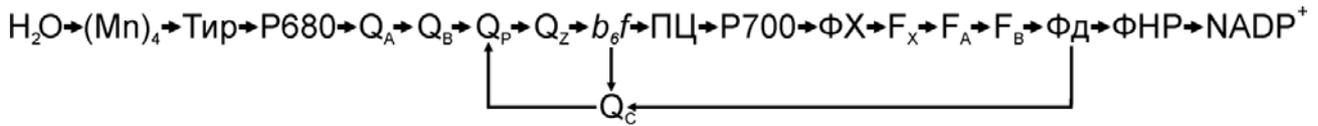


**Рис. 3.** Зависимое от различных акцепторов электронов окисление SkQ1, восстановленного  $NaBH_4$ . Окисление SkQ1 регистрировали по разности оптической плотности его окисленной и восстановленной форм при 270 нм (D270). К раствору 50 мкМ SkQ1 в воде добавляли 0,2 мМ  $NaBH_4$ , регистрировали разность D270 до добавки  $NaBH_4$ , и через 1 мин после его добавки. Акцепторы электронов вводили через 1,5–2 мин после  $NaBH_4$ . Долю окислившегося SkQ1 измеряли спустя 5 или 8 мин. При этом учитывали вклад  $NaBH_4$  и акцепторов электронов в D270

тивный редокс-медиатор циклического переноса электронов [20] восстанавливаясь аскорбатом, сам по себе вызывает поглощение  $O_2$  и, подобно SkQ1, подавляет и выделение, и поглощение  $O_2$  освещенными хлоропластами (рис. 5).

SkQ1 как акцептор электронов в концентрации 10 мкМ поддерживал незначительное выделение  $O_2$ , которое прекращается с увеличением концентрации до 100 мкМ, при которой дальнейшее добавление феррицианида уже неэффективно (рис. 6).

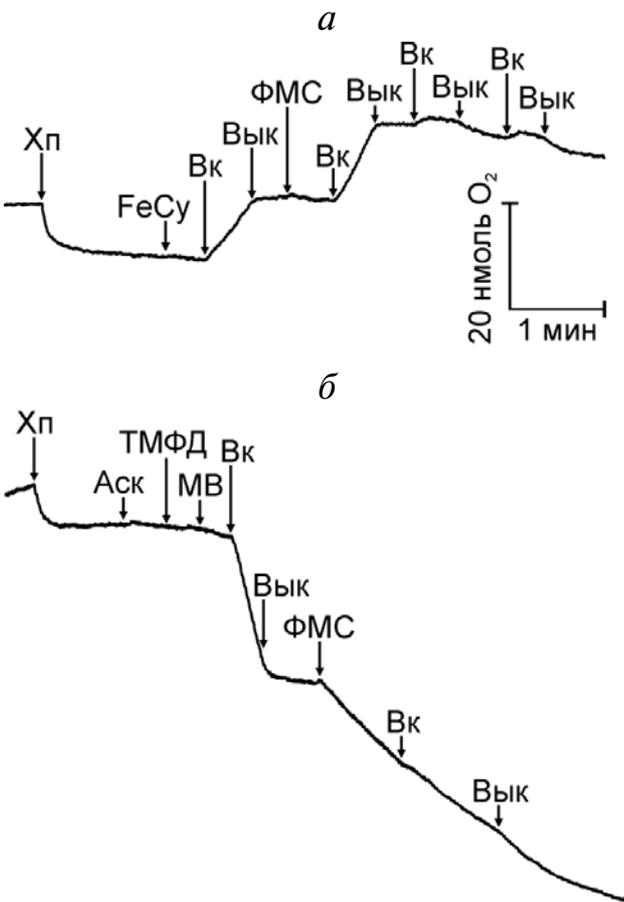
Рис. 7 показывает действие SkQ1 на дыхание митохондрий, выделенных из корней проростков гороха. SkQ1 не влияет на окисление добавленного NADH и лишь с повышением концентрации незначительно стимулирует его. Как отмечалось ранее [21], добавленный NADH окисляется исключительно через главный (цитохромный) путь дыхательной цепи, минуя альтернативную оксидазу, поэтому процесс полностью ингибируется KCN (рис. 7, *а*). Ротенон, ингибитор комплекса I дыхательной цепи, не влияет, а ингибитор альтернативной оксидазы салицилгидроксамат (СГ) не тормозит, напротив, стимулирует окисление добавленного NADH, чувствительное к KCN (рис. 7, *б*), что свидетельствует о регуляции цитохромной ветви дыха-



**Рис. 4.** Нециклическая и циклическая электрон-транспортные цепи в хлоропластах. Обозначения: (Mn)<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>O-дегидрогеназа, содержащая 4 атома Mn, Тир – тирозин-161 субъединицы D1 комплекса реакционного центра фотосистемы II Р680, Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> – первичный и вторичный пластохиноны комплекса Р680, Q<sub>P</sub> – пластохинон мембранного фонда хлоропластов, Q<sub>Z</sub> и Q<sub>C</sub> – пластохиноны b<sub>6</sub>f-цитохромного комплекса (b<sub>6</sub>f), ПЦ – пластоцианин, Р700 – комплекс реакционного центра фотосистемы I, включающий филлохинон ФХ и FeS-центры F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub> и F<sub>B</sub>, ФД – ферредоксин, ФНР – ферредоксин:NADP<sup>+</sup>-редуктаза. Стрелками отмечены этапы переноса электронов

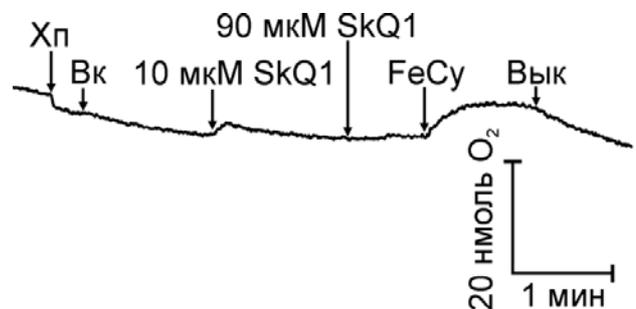
тельной цепи со стороны альтернативной оксидазы. Дыхание митохондрий с NADH в качестве субстрата незначительно стимулируется SkQ1 в присутствии салицилгидроксамата (рис. 7, в),

как и в его отсутствие (рис. 7, а). Окисление сукцината в митохондриях стимулируется SkQ1 вплоть до 100 мкМ, значительно тормозится салицилгидроксаматом и блокируется при последующем добавлении KCN (рис. 7, з). Стимуляция дыхания митохондрий посредством SkQ1, по-видимому, связана с его разбавляющим действием: в микромолярных концентрациях SkQ1 подавляет генерацию Δψ в митохондриях сердца крыс [22].

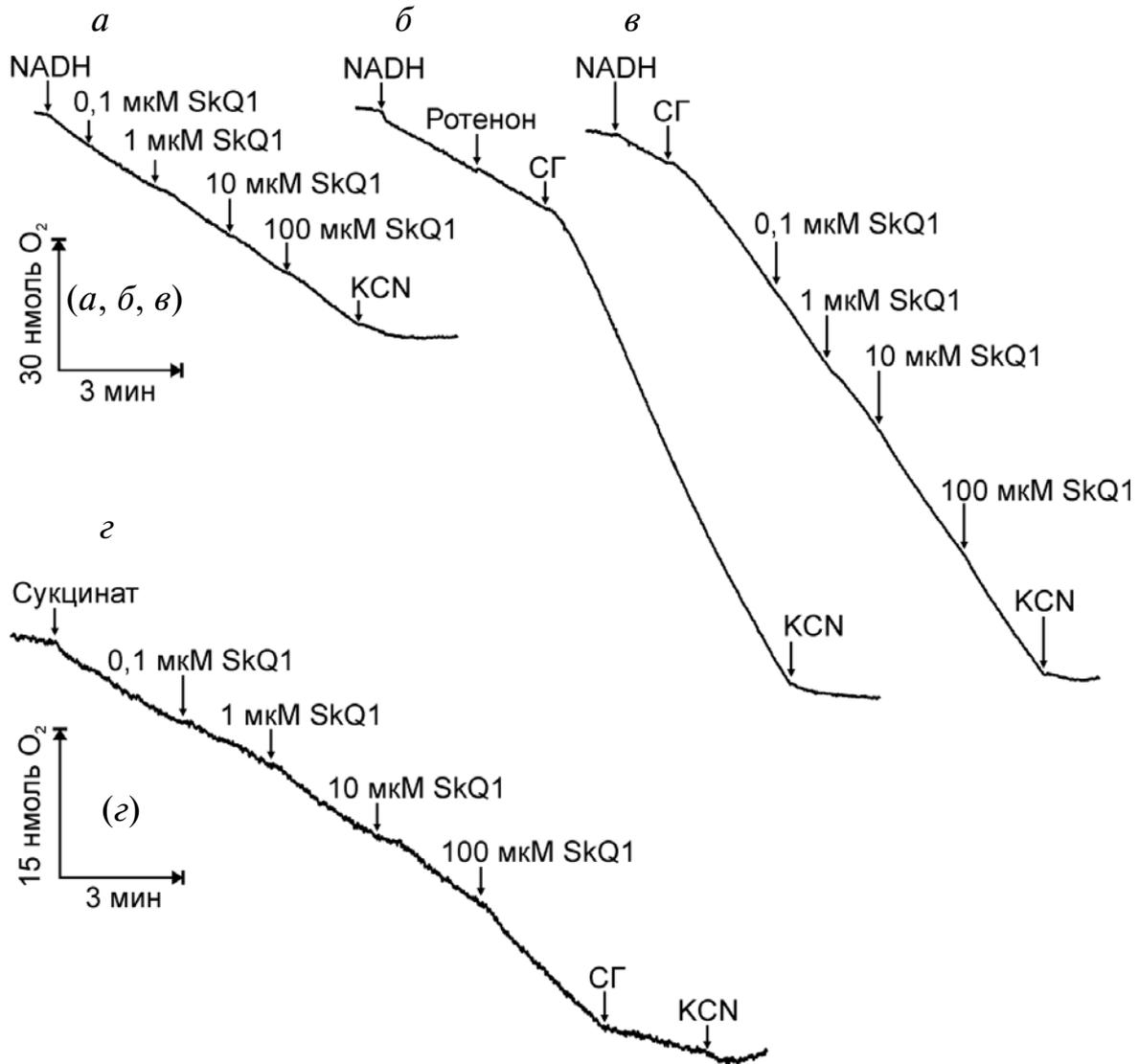


**Рис. 5.** Действие феназинметосульфата (ФМС). а – На выделение O<sub>2</sub> при переносе электронов от H<sub>2</sub>O на феррицианид (FeCy); б – на поглощение O<sub>2</sub> при переносе электронов от аскорбата (Аск) + N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамина (ТМФД) на метилвиологен (МВ). Условия инкубации хлоропластов см. рис. 2. Xп – хлоропласты, Вк и Вык – включение и выключение света. Добавки: 0,1 мМ FeCy, 0,1 мМ ФМС, 0,1 мМ Аск, 0,1 мМ ТМФД, 50 мкМ МВ

Полученные результаты показывают, что SkQ1 в наномолярных концентрациях проявляет себя как антиоксидант, подавляющий образование АФК в митохондриях и хлоропластах (рис. 1), а с повышением концентрации до 100 мкМ подавляет нециклический перенос электронов в фотосистемах II и I (рис. 2). В отличие от *n*-бензохинона, SkQ1 не поддерживает нециклический перенос электронов с выделением O<sub>2</sub> (рис. 6) и ингибирует реакции с феррицианидом, *n*-бензохиноном, кремнемолибдатом и метилвиологеном в качестве акцепторов электронов (рис. 2). Различия в чувствительности этих реакций к SkQ1 обусловлены свойствами этих акцепторов (рис. 3): будучи восстановленным NaBH<sub>4</sub>, SkQ1 окисляется феррицианидом, *n*-бензохиноном и



**Рис. 6.** SkQ1 как акцептор электронов в освещенных хлоропластах. Условия инкубации хлоропластов – см. рис. 2. Xп – хлоропласты; Вк и Вык – включение и выключение света. Добавки: SkQ1, 2 мМ FeCy



**Рис. 7.** Действие SkQ1 на дыхание митохондрий из корней проростков гороха с NADH или сукцинатом в качестве субстратов окисления. В оксиметрическую ячейку (1,5 мл) со средой инкубации митохондрий, содержащей 50 мМ Трицин-КОН, 35 мМ NaCl и 0,4 М сахарозы (рН 7,8), добавляли митохондрии с содержанием белка 0,21–0,42 мг/мл, 1 мМ NADH, SkQ1, 2,5 мМ KCN, 1 мкМ ротенон, 2 мМ салицилгидроксамат (СГ), 5 мМ сукцинат

в меньшей мере кремнемолибдатом, но не метилвиологеном. Подавление нециклического переноса электронов, по-видимому, связано с переключением фотосинтетической редокс-цепи с нециклического пути в режим циклического переноса электронов. Действительно, по своему действию SkQ1 сходен с феназинметосульфатом, переключающим редокс-цепь хлоропластов в циклический режим (рис. 5).

Авторы выражают благодарность академику В.П. Скулачеву и сотрудникам НИИ Митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова за предос-

тавленные митохондриально-направленные хиноны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12-04-31622 мол\_а, 14-04-00507 а).

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова, приобретенное за счет средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V.P. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis, *Apoptosis*, **11**, 473–485.
- Самуилов В.Д., Лагунова Е.М., Дзюбинская Е.В., Изюмов Д.С., Киселевский Д.Б., Макарова Я.В. (2002) Участие хлоропластов в программируемой гибели клеток у растений, *Биохимия*, **67**, 757–765.
- 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.
- Liberman, E.A., and Skulachev, V.P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30–42.
- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ladgerwood, E.C., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2001) Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells. Antioxidant and antiapoptotic properties, *J. Biol. Chem.*, **276**, 4588–4596.
- Dhanasekaran, A., Kotamraju, S., Kalivendi, S.V., Matsunaga, T., Shang, T., Keszler, A., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2004) Supplementation of endothelial cells with mitochondria-targeted antioxidants inhibit peroxide-induced mitochondrial iron uptake, oxidative damage, and apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **279**, 37575–37587.
- James, A.M., Cocheme, H.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2005) Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools, *J. Biol. Chem.*, **280**, 21295–21312.
- Скулачев В.П. (2007) Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «мегапроект» по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы, *Биохимия*, **72**, 1700–1714.
- Васильев Л.А., Дзюбинская Е.В., Киселевский Д.Б., Шестак А.А., Самуилов В.Д. (2011) Программируемая гибель клеток растений: защитное действие митохондриально-направленных хинонов, *Биохимия*, **76**, 1374–1386.
- Барский Е.Л., Губанова О.Н., Самуилов В.Д. (1991) Ингибирование фотосинтетического переноса электронов в хлоропластах *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразоном, *Биохимия*, **56**, 434–438.
- Millenaar, F.F., Benschop, J.J., Wagner, A.M., and Lambers, H. (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the *in vivo* reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase, *Plant Physiol.*, **118**, 599–607.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, **24**, 1–15.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85.
- 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.
- Wrona, M., Patel, K., and Wardman, P. (2005) Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals, *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 262–270.
- Васильев Л.А., Дзюбинская Е.В., Зиновкин Р.А., Киселевский Д.Б., Лобышева Н.В., Самуилов В.Д. (2009) Вызванная хитозаном программируемая гибель клеток у растений, *Биохимия*, **74**, 1270–1279.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases, *Plant Physiol.*, **141**, 336–340.
- Graan, T. (1986) The interaction of silicomolybdate with the photosystem II herbicide-binding site, *FEBS Lett.*, **206**, 9–14.
- Fujii, T., Yokoyama, E., Inoue, K., and Sakurai, H. (1990) The sites of electron donation of Photosystem I to methyl viologen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 41–48.
- Braun, G., Driesenaar, A.R.J., Shalgi, E., and Malkin, S. (1992) Manipulation of the imbalance for linear electron flow activities between photosystems I and II of photosynthesis by cyclic electron flow cofactors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 57–66.
- Moore, A.L., and Siedow, J.N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 121–140.
- Severina, I.I., Severin, F.F., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Пыасова, Т.М., Simonyan, R.A., Rogov, A.G., Trendeleva, T.A., Zvyagil'skaya, R.A., Dugina, V.B., Domnina, L.V., Fetisova, E.K., Lyamzaev, K.G., Vyssokikh, M.Yu., Chernyak, B.V., Skulachev, M.V., Skulachev, V.P., and Sadovnichii, V.A. (2013) In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: Thymoquinone and its cationic derivatives, *FEBS Lett.*, **587**, 2018–2024.

**EFFECT OF CATIONIC PLASTOQUINONE SkQ1  
ON ELECTRON TRANSPORT REACTIONS  
IN CHLOROPLASTS AND MITOCHONDRIA  
FROM PEA SEEDLINGS**

**V. D. Samuilov\*, D. B. Kiselevsky**

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,  
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3807,  
E-mail: vdsamuilov@mail.ru*

Received August 14, 2014

Revision received December 4, 2014

Plastoquinone bound with decyltriphenylphosphonium cation (SkQ1) penetrating through membranes inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in cells of the epidermis from leaves of pea seedlings at nanomolar concentrations, which was detected from the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein. Photosynthetic electron transfer in chloroplasts isolated from pea leaves is suppressed by SkQ1 at micromolar concentrations: electron transfer in chloroplasts under the action of photosystem II or I (with silicomolybdate or methyl viologen as electron acceptors, respectively) is more sensitive to SkQ1 than under the action of photosystem II + I (with ferricyanide or *p*-benzoquinone as electron acceptors). SkQ1 reduced by borohydride is oxidized by ferricyanide, *p*-benzoquinone, and, to a lesser extent, by silicomolybdate, but not by methyl viologen. SkQ1 is not effective as an electron acceptor supporting the evolution of O<sub>2</sub> from water in illuminated chloroplasts. The data on suppression of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution or consumption show that SkQ1, similar to phenazine methosulfate, causes the conversion of the chloroplast redox chain from noncyclic electron transport mode to cyclic mode without O<sub>2</sub> evolution. NADH or succinate oxidation in mitochondria isolated from pea roots is stimulated by SkQ1.

*Key words:* programmed cell death, mitochondria-targeted quinones, SkQ1, electron transfer, retardation in chloroplasts, stimulation in mitochondria