

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624132>

Оригинальное исследование



Метабомика старения гетеротрофных суспензионных культур *Nicotiana tabacum* L. VBI-0

Р.К. Пузанский^{1, 2}, А.А. Кирпичникова², А.Л. Шаварда^{1, 2}, В.В. Емельянов², М.Ф. Шишова²¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия;² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Гетеротрофные клеточные культуры широко используют в качестве модельных объектов в биологии растений. В процессе развития культуры меняется состав среды: истощается субстрат, накапливаются продукты метаболизма, растет плотность клеток. В финальной фазе рост останавливается и через непродолжительное время культура погибает. Эти процессы сопровождаются физиологическими изменениями клеток, которые можно назвать старением культуры. Методом газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, было проведено профилирование метаболитов гетеротрофных клеток *Nicotiana tabacum* VBI-0, поддерживаемых в суспензионной культуре. Сравнивали клетки культур возрастом 7 сут, во время интенсивного роста биомассы, и 28 сут, когда культура находилась в стационарной фазе. Было установлено, что старение сопряжено с падением накопления аминокислот. В то же время возрастал уровень пентоз и сложных сахаров, включая сахарозу, тогда как уровень глюкозы, фруктозы и сахарофосфатов снижался. Для стареющих культур характерен больший уровень накопления малата, пирувата и некоторых других карбоксилатов. Таким образом, полученные метаболомные данные свидетельствуют, что старение сопряжено с изменением обмена аминокислот, снижением активности начального этапа гликолиза, накоплением сложных сахаров, пентоз и карбоксилатов.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* VBI-0; метаболомика; старение; суспензионная культура.

Как цитировать

Пузанский Р.К., Кирпичникова А.А., Шаварда А.Л., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. Метабомика старения гетеротрофных суспензионных культур *Nicotiana tabacum* L. VBI-0 // Экологическая генетика. 2024. Т. 22. № 2. С. 161–173. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624132>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624132>
Original Study Article

Senescence metabolomics of *Nicotiana tabacum* L. VBI-0 heterotrophic suspension cultures

Roman K. Puzanskiy^{1,2}, Anastasiia A. Kirpichnikova², Alexey L. Shavarda^{1,2},
Vladislav V. Yemelyanov², Maria F. Shishova²

¹ Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Heterotrophic cell cultures are widely used as a model in plant biology. During a culture cycle the composition of the medium changes: the sucrose and other substrates are depleted, metabolism products are accumulated and the density increases. Finally, arrest of a growth is followed by cell death in a short time. These processes are accompanied with physiological alterations, corresponding to senescence.

AIM: To resolve metabolic features of tobacco cells in growing and stationary senescent suspension cultures VBI-0.

MATERIALS AND METHODS: *Nicotiana tabacum* VBI-0 cells were cultured in suspension MS medium supplied with 3% sucrose. Cells were sampled at 7th day, during intensive growth, and at 28th day, when the culture was in the stationary phase. The GC-MS method was used to profile the metabolites.

RESULTS: Sucrose depletion in media caused starvation of heterotrophic tobacco cell culture and was associated with a decrease in the accumulation of free amino acids. At the same time, the level of pentoses and complex sugars, including sucrose, increased, while the levels of glucose and fructose were not changed significantly and levels of hexose phosphates decreased. During culture senescence cells showed higher levels of accumulation of malate, pyruvate and some other carboxylates.

CONCLUSIONS: The metabolomic data indicate that culture senescence was associated with a drop in amino acids metabolism, a decrease in the activity of the upper part of glycolysis, and the accumulation of complex sugars, pentoses and carboxylates.

Keywords: *Nicotiana tabacum* VBI-0; metabolomics; plant cell culture; senescence; carbon starvation.

To cite this article

Puzanskiy RK, Kirpichnikova AA, Shavarda AL, Yemelyanov VV, Shishova MF. Senescence metabolomics of *Nicotiana tabacum* L. VBI-0 heterotrophic suspension cultures. *Ecological genetics*. 2024;22(2):161–173. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624132>

Received: 01.12.2023

Accepted: 05.12.2023

Published online: 28.06.2024

АКТУАЛЬНОСТЬ

Клеточные культуры высших растений, в том числе трансформированные, широко используют в качестве модельных систем для изучения целого ряда процессов, реализующихся в растительных организмах, в том числе деления, эмбриогенеза, дифференциации, различных этапов первичного и вторичного метаболизма и др. [1, 2]. Изучение культур позволяет углубить понимание клеточных механизмов адаптации растительных организмов к биотическим [3] и абиотическим стрессорам [4]. Наряду с этим культуры растительных клеток широко востребованы в современной биотехнологии для получения биологически активных соединений, гетерологичных белков и т. д. [5]. Применение асептических строго контролируемых условий позволяет достичь высокой воспроизводимости результатов, синхронизации клеточного цикла и высокой скорости роста [2, 6]. Культуры клеток растений могут быть как фотосинтезирующими [7], так и гетеротрофными [1]. Гетеротрофные культуры поддерживаются в темноте, а единственным источником углерода и энергии у них становятся органические соединения, входящие в состав среды. Клетки растений способны потреблять экзогенные органические соединения, особенно, сахарозу [8], являющуюся основной транспортируемой формой углерода у высших растений [9].

Включение сахарозы в метаболизм начинается с расщепления, которое осуществляется двумя типами ферментов — инвертазами и сахарозосинтазами. Инвертазы гидролизуют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Кислые инвертазы локализованы в вакуоли, нейтральные/щелочные — в цитоплазме и апопласте [10]. Сахарозосинтазы расщепляют молекулы сахарозы на фруктозу и УДФ-глюкозу, которая является предшественником в синтезе ряда метаболитов. Вероятно, несколько путей включения сахарозы в метаболизм могут работать параллельно, и тогда возникает вопрос об их соотношении в норме и при стрессе. Продукты гидролиза сахарозы могут быть катаболизированы через гликолиз, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и пентозофосфатный путь для получения энергии. С другой стороны, экзогенный углерод может быть вовлечен в накопление биомассы, направлен в синтез amino- и жирных кислот или других соединений. Помимо этого, поступающий углерод может быть депонирован в форме крахмала или липидов. Интенсивность перечисленных процессов метаболизма зависит от видовых особенностей исследуемой культуры клеток, физиологической и биохимической активности составляющих ее клеток и меняется в процессе развития.

Очевидно, что в процессе роста культур происходит истощение субстрата и развивается голодание. Первым последствием голодания является падение физиологической активности. Удаление сахарозы ведет к быстрому снижению уровня дыхания [11, 12]. Падает экспрессия генов, кодирующих ферменты ЦТК и окислительного

фосфорилирования [13]. Падает и уровень гликолиза, что выражается в снижении уровня фосфатов сахаров [14, 15] и экспрессии генов соответствующих ферментов [13, 11]. Кроме того, при голодании клеток наблюдается мобилизация резервов. Быстрым, но кратковременным источником углерода служат вакуолярные пулы сахарозы и малата [14]. Отмечено усиление экспрессии некоторых генов, связанных с гидролизом крахмала [13]. Происходит мобилизация липидов, которая обеспечивается индукцией генов липаз и ферментов окисления жирных кислот [13, 11]. Вместе с этим может иметь место деградация мембран [16]. Дополняется картина снижением экспрессии генов ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот [11]. Показано, что голодание клеток характеризуется высокой протеолитической активностью, так как аминокислоты также могут быть источником углерода при голодании. На это указывает рост уровня экспрессии генов ферментов, связанных с катаболизмом аминокислот [17], особенно с катаболизмом разветвленных аминокислот [18]. Этот процесс влечет за собой перестройку азотного обмена [19]. Однако голодание гетеротрофных культур может длиться только очень ограниченный период времени. В случае суспензионных культур арабидопсиса уже после 24 ч голодания жизнеспособность клеток начинает быстро падать. После 48 ч культура теряет возможность восстанавливаться после пересева, что указывает на невозможность восстановления нового цикла развития, начинающегося с пролиферации [11].

Истощение нутриентов и другие изменения среды порождают комплекс физиологических процессов, заканчивающихся гибелью культуры, этот этап можно назвать старением. Происходит остановка роста, снижается уровень дыхания и синтетических процессов [20, 21]; меняется состав жирных кислот [22]; изменяется морфология и число органелл [23–25]. Особый интерес вызывает сравнительный анализ процессов, протекающих в культурах клеток растений при голодании и на поздних стадиях развития, с таковыми при онтогенетическом или индуцированном старении клеток в составе нативных органов растений [26, 19]. Было установлено, что старые голодающие гетеротрофные культуры арабидопсиса существенно отличаются от онтогенетически стареющих органов растений на транскрипционном уровне. Лишь около 40 % генов арабидопсиса, экспрессия которых повышалась в стареющей культуре клеток, характеризовались ростом экспрессии в листьях при старении, индуцированном темнотой [27]. Дальнейшее исследование особенностей онтогенетического старения, углеродного голодания и старения культур необходимо для анализа онтогенеза и трофического уровня адаптации растений.

Можно заключить, что усвоение субстрата и метаболический ответ на его дефицит, прежде всего, связаны с центральным метаболизмом. Центральным (первичным) метаболизмом — это собирательное понятие совокупности обменных процессов, обеспечивающих клетку углеродом,

энергией и метаболитами, необходимыми для поддержания жизнедеятельности и предшественниками для синтеза вторичных соединений [28, 29]. Совокупность первичных метаболитов, представленных по большей части небольшими молекулами, такими как C_2 – C_5 -карбоновые кислоты, аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты и др., составляют специфичный метаболический профиль, характеризующий состояние биологического объекта. Перспективным методом для проведения метаболического профилирования представляется газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ГХ-МС), — один из основополагающих методов метаболомики [30].

В представленном исследовании проведено сравнение метаболомных профилей гетеротрофной клеточной культуры VBI-0, полученной из паренхимы стебля *Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia Bright Italia 0 [31]. Суспензионная культура VBI-0, так же как и культура Ву-2 (*N. tabacum* L., cv. Bright Yellow 2), является легко синхронизируемой и имеющей специфический нитевидный фенотип [32]. Клетки на разных стадиях развития хорошо различаются морфологически: небольшие клетки, образующие цепи в период пролиферации в течение первой недели роста, и одиночные крупные вытянутые клетки после двух недель в стационарной фазе [33]. Именно клетки этих двух стадий, контрастных по своему физиологическому состоянию, были использованы в этом исследовании. Профилирование метаболитов было выполнено в период роста биомассы (7-е сутки) и на этапе старения, в преддверии гибели (28-е сутки).

Цель — выявить метаболические различия клеток растущих и стареющих стационарных суспензионных культур клеток табака VBI-0.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Модельным объектом работы является этилированная суспензионная культура, *Nicotiana tabacum* L. (VBI-0, культура, Virginia Bright, Italia). Культуру поддерживали в темноте, при температуре 26 °C и постоянном перемешивании на ротационном шейкере (120 об/мин). Пробы отбирали из культур возрастом 7 сут (рост биомассы) и 28 сут (старение). Для анализа отбирали 200 мг сырой биомассы путем фильтрации с помощью водоструйного вакуумного насоса.

Пробоподготовка

Пробы быстро замораживали в жидком азоте. Клетки разрушали в шаровой мельнице (Tissue Lyser LT, QIAGEN, Германия). Экстракцию проводили охлажденной смесью метанол – хлороформ – вода в соотношении 5 : 2 : 2. После экстракции пробы очищали от остатков клеток центрифугированием в течение 10 мин, 15 000 g при 4 °C. Экстракт выпаривали в вакуумном испарителе. Высушенный материал растворяли в смеси пиридина и силилирующего

агента BSFA – TMCS (99 : 1), с добавлением внутреннего стандарта (трикозан, нормальный углеводород C_{23}). Материал дериватизировали, инкубируя пробы при 90 °C в течение 20 мин.

Профилирование метаболитов

Для ГХ-МС-анализа использовали газовый хроматограф Agilent 5860, сопряженный с масс-спектрометром Agilent 5975C (Agilent Technologies, США). Для автоматического ввода проб использовали автосэмплер Agilent 7693A. Разделение проводили на капиллярной колонке DB5-HT (Agilent Technologies, США). Газ-носитель — гелий, постоянный поток 1 мл/мин, температура испарителя 250 °C, в режиме splitless, температурный режим термостата колонки: начальная температура 70 °C, затем линейное повышение со скоростью 4°/мин до 320 °C.

Для обработки хроматограмм использовали программное обеспечение PARADISE [34] в сочетании с NIST MS Search (National Institute of Standards and Technology, NIST, США). Дополнительно, для деконволюции и идентификации метаболитов использовали AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST, США). Соединения аннотировали по совпадению полученных масс-спектров ($MF > 800$) и индексов удерживания Ковача с библиотечными записями в NIST2020 (США), Golm Metabolome Database (GMD, Германия) [35] и собственной библиотеки Лаборатории аналитической фитохимии Ботанического института РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Статистический анализ и визуализация

Анализ данных был проведен в среде R4.3.1 «Beagle Scouts». Данные были нормализованы на медиану наблюдения, логарифмированы и стандартизированы. Если соединение отсутствовало в образце, но присутствовало в остальных повторностях, это считали технической ошибкой и проводили импутацию с помощью метода KNN (k-ближайших соседей) с применением пакета impute [36]. Анализ методом главных компонент (PCA, principal component analysis) проводили с помощью pcaMethods [37]. Дискриминантный анализ методом ортогональных проекций на латентные структуры (OPLS-DA, orthogonal projections in latent structure — discriminant analysis) выполняли с помощью пакета ropls [38]. Для анализа обогащения наборов метаболитов (metabolite set enrichment analysis, MSEA) применяли пакет fgsea [39]. Наборы метаболитов для биохимических путей для MSEA и реакционные пары для построения метаболической карты были загружены из базы данных KEGG [40] с использованием пакета KEGGREST [41]. Список метаболитов, относящихся к различным биохимическим путям, корректировали вручную, поскольку для некоторых метаболитов были добавлены необходимые пути. Соединения, для которых был аннотирован класс, помещали в соответствующие пути. Метаболическая карта была построена на платформе Cytoscape [42].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На 7-е сутки культуры характеризовались интенсивным ростом плотности биомассы. На 28-е сутки плотность сырой массы не изменялась более 7 дней, что свидетельствует о полном исчерпании ресурсов и завершении развития культуры (рис. 1).

В результате анализа ГХ-МС были получены профили метаболитов, которые включали около 300 соединений, 84 из них были определены по совпадению масс-спектров и индексов удерживания с библиотечными, а еще для 44 был аннотирован химический класс. Остальные спектры не были идентифицированы, но были использованы в анализе. Наиболее многочисленными в полученных профилях метаболитов были сахара и их производные (в сумме около 60), сахароспирты, сахарокислоты, фосфосахара, пентозы (включая рибозу), гексозы (в том числе глюкоза и фруктоза), олигосахариды, например сахароза. Было аннотировано большое число сложных молекул, содержащих остатки сахаров, объединяющих, по-видимому, многочисленные ди- и трисахариды, а также вторичные соединения, такие как гликозиды. Профили также включали 24 аминокислоты, из них 17 стандартных, около 20 карбоновых кислот, среди которых присутствовали интермедиаты энергетического обмена. В небольшом количестве обнаружены свободные жирные кислоты и стерины.

Для определения сходства профилей культур в фазе роста и старения был проведен PCA. На рис. 2 профили метаболитов рассеяны в пространстве счетов главных компонент (ГК). Можно видеть, что наблюдения четко разделены в соответствии с возрастом вдоль ГК1, объясняющей 56,8 % дисперсии. Индивидуальные различия культур одного возраста связаны с ГК2, объясняющей 23 %.

Поскольку профили метаболитов группировались в соответствии со стадиями развития культуры, на следующем этапе для выявления метаболитов, накапливающихся дифференциально в зависимости от стадии развития, был проведен дискриминантный анализ методом ортогональных проекций на латентные структуры (OPLS-DA). Отбор метаболитов, связанных со старением, мы проводили по величине VIP (variable importance in projection) [38]. На рис. 3 результаты представлены на упрощенной карте центрального метаболизма, построенной на основе главных реакционных пар (субстрат – продукт) из базы данных KEGG [40].

Показано, что стареющие культуры отличались от растущих более высоким уровнем сложных сахаров, в том числе сахарозы, при этом уровень глюкозы и фруктозы существенно не различался. Вместе с этим объемы пулов фосфатов гексоз или не менялись, или сокращались. Старение также было связано с накоплением пентоз и в небольшой степени гексоз. Уровень конечного продукта гликолиза — пирувата, а также малата был выше

в стационарных культурах. При этом уровень других зарегистрированных интермедиатов ЦТК не показал различий. Интересно, что уровень многих других карбоновых кислот, не вовлеченных напрямую в энергетический метаболизм, вырос. Наиболее ярким отличием профилей метаболитов стареющих культур представляется падение накопления почти всех свободных аминокислот. В их число входят интермедиаты азотного обмена: глутамат, глутамин и орнитин. Интересно, что на фоне этого наблюдалось значительное накопление мочевины. Можно отметить, что только на стадии роста была обнаружена аминокислота, являющаяся предшественником

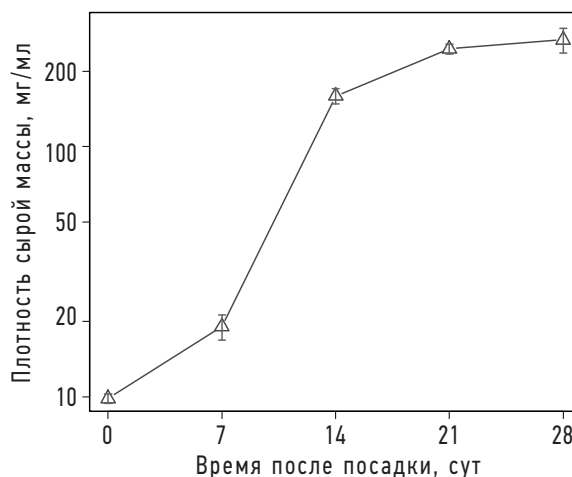


Рис. 1. Рост гетеротрофной суспензионной культуры *N. tabacum* VBI-0

Fig. 1. Growth of heterotrophic suspension cell culture *N. tabacum* VBI-0: fresh weight density mg per ml

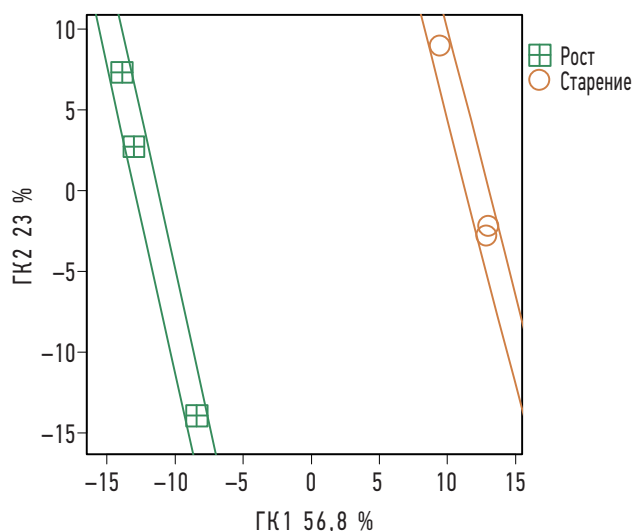


Рис. 2. Рассеяние профилей метаболитов в пространстве счетов главных компонент (ГК), полученных при анализе суспензионных культур клеток *N. tabacum* VBI-0 на стадиях роста и старения. Эллипсы — 95 % доверительные интервалы, % — доля дисперсии, связанная с главной компонентой

Fig. 2. Score plot from PCA of metabolite profiles extracted from heterotrophic suspension cell culture *N. tabacum* VBI-0 at growth and senescence. Ellipses — are the 95% confidence intervals, % — percent of variation

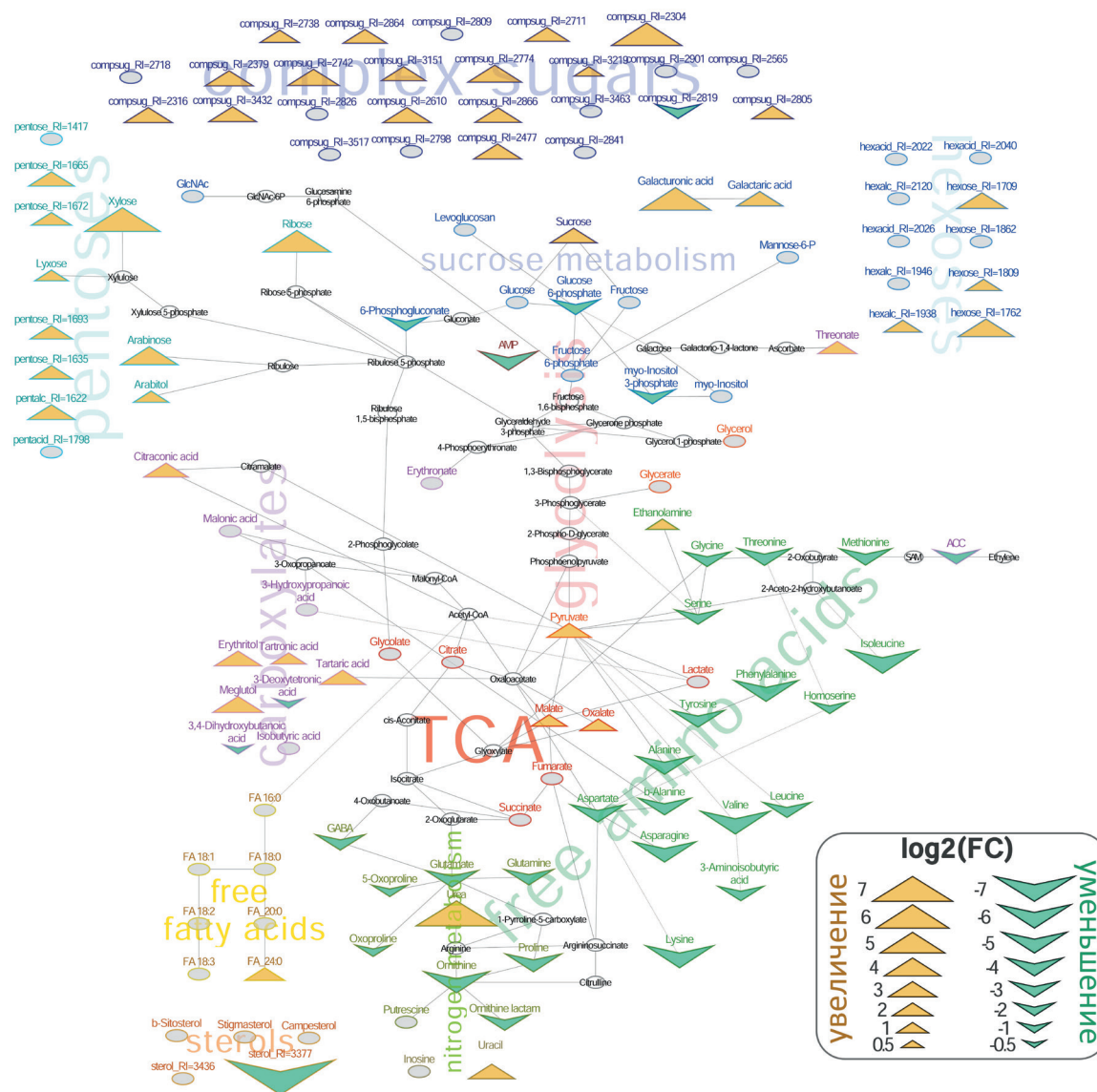


Рис. 3. Визуализация метаболитов, дифференциально накапливающихся (ДНМ), в растущих и стареющих культурах клеток *N. tabacum* VBI-0. Выбор ДНМ осуществлен по VIP > 1. FC — кратность различий средних значений (fold changes). Увеличение соответствует более высокому накоплению на стадии старения

Fig. 3. Visualization of differentially accumulated metabolites (DAMs) in suspension cell culture *N. tabacum* VBI-0 at growth and senescence stages. DAMs were selected by rule: VIP > 1. Increase refers to higher level at senescence. FC — fold changes

этилена. В уровне стероидов и свободных жирных кислот различий почти не наблюдалось. Исключением было сильное падение содержания одного неидентифицированного стерина и рост одной жирной кислоты с очень длинной цепью (C₂₄), лигноцериновой (рис. 3).

Чтобы определить связь изменений с биохимическими путями, реализуемыми в растительной клетке, мы провели анализ обогащения. Он позволяет оценить силу и вероятность направленных согласованных изменений накопления набора метаболитов [39]. Мы использовали списки метаболитов биохимических путей из базы KEGG [40]. Результат представлен на рис. 4. Как можно заметить, стареющие культуры отличались от растущих большим накоплением сахаров, вовлеченных в метаболизм сахарозы, галактозы и аскорбата. При этом уменьшались

пулы аминокислот, что может быть связано с репрессией синтеза белка и, возможно, азотосодержащих вторичных соединений, предшественниками которых они являются. Интермедиаты ЦТК, путей синтеза стероидов и жирных кислот не показали достоверных однонаправленных изменений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Состав профилей метаболитов культур клеток VBI-0 был сходен с таковыми у нативных проростков табака [43]. При том что спектры были получены и аннотированы близкими методами, количество соединений в профилях культуры было существенно меньшим. Как в проростках, так и в культурах наиболее широко представленной

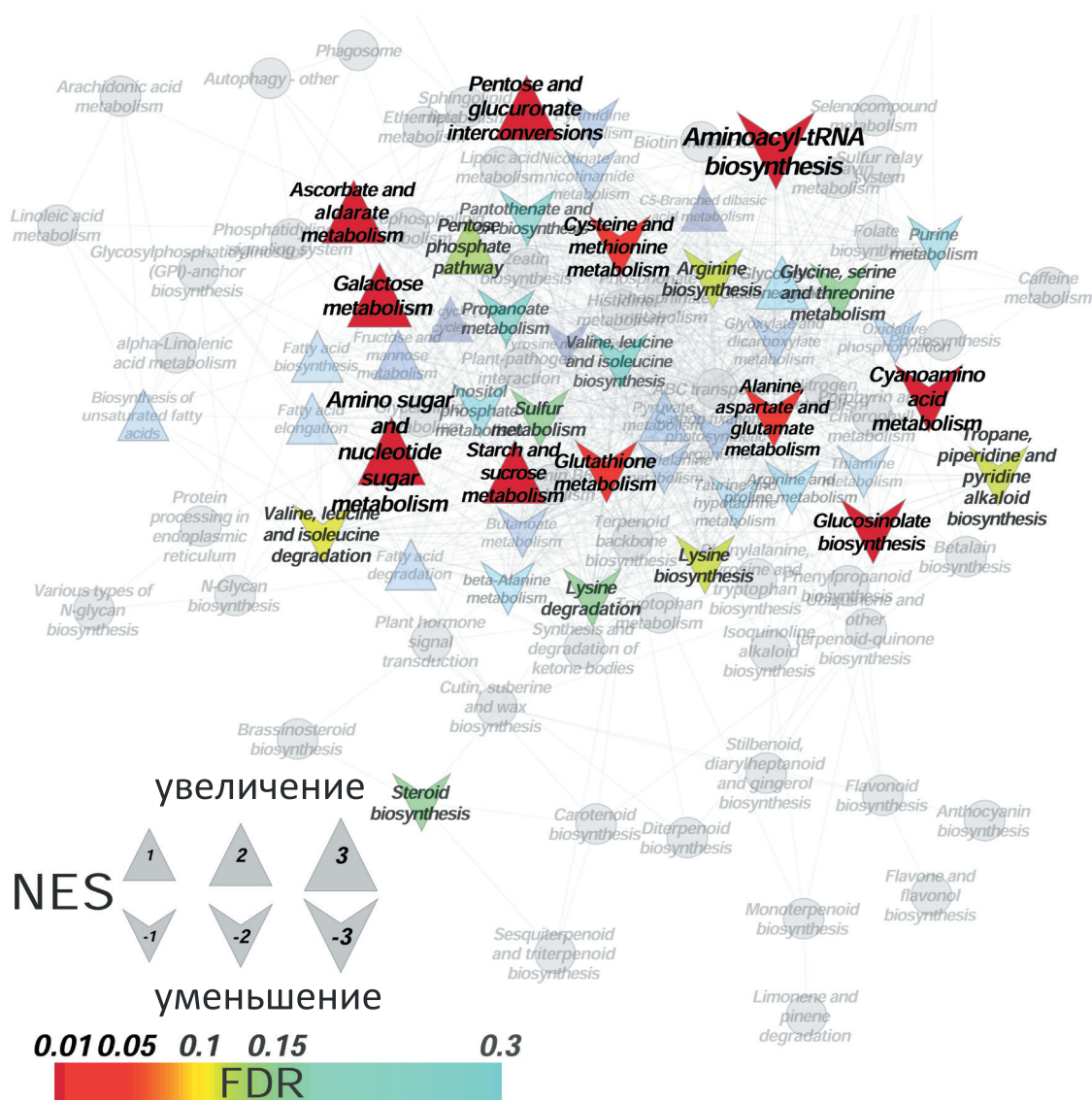


Рис. 4. Анализ обогащения, полученный на основе нагрузок предиктивной компоненты ОПЛС-ДА. Сеть метаболических путей, реализуемых в клетках *N. tabacum*. Узлы — метаболические пути из базы данных KEGG. Если они имеют общие метаболиты в профиле, то они соединены ребрами, которые их стягивают. Размер — NES, нормализованная оценка обогащения (normalized enrichment score), цвет — FDR, уровень ложноположительных результатов (false discovery rate). Треугольники с вершиной, направленной вверх соответствуют более высокому накоплению интермедиатов пути при старении

Fig. 4. Metabolite sets enrichment analysis based on loadings from OPLS-DA classification. Nodes of graph are KEGG pathways for *N. tabacum*, edges, contracting nodes, are presence of common metabolites in profiles. Size — strength of influence (NES, normalized enrichment score), color — FDR (false discovery rate), up triangles refer to accumulation of pathway intermediates at senescence

группой были углеводы. Тем не менее в случае культур число соединений, аннотированных как углеводы, было в полтора раза меньше, чем в случае проростков. Главным образом, в культурах наблюдалось меньше сложных углеводов. Причиной этого может являться дифференцировка органов, тканей и клеток в многоклеточном организме, которая прослеживается и на биохимическом уровне [44]. С другой стороны, проростки обладают полнофункциональными пластидами, освещаются и осуществляют фотосинтез, что предположительно расширяет метаболическую сеть и делает профиль метаболитов более разнообразным. Нужно также иметь в виду, что остатки сахаров входят в состав многих вторичных соединений [45],

а синтез специализированных молекул запускается обычно в ответ на неблагоприятные воздействия [3, 46]. Поскольку экспериментальные суспензионные культуры поддерживали в стабильных и благоприятных условиях, механизмы синтеза многих вторичных соединений могли быть неактивными. С этим согласуется тот факт, что анализируемые культуры клеток отличались меньшим числом идентифицированных вторичных соединений. Например, в культурах табака не детектировали никотин, столь характерный для *N. tabacum*. Подчеркнем, что эти соединения были идентифицированы в проростках [43]. И последнее, важным фактором формирования профиля углеводов может быть изменение состава клеточной стенки.

Появление большого числа олигосахаридов в профиле исследованных нами культур может быть результатом частичной деградации полисахаридов клеточной стенки, что ранее было отмечено в процессе развития суспензионных культур табака.

Хорошо известно, что органы и ткани растений с возрастом претерпевают физиологические изменения. Это выражается и в том, что профили метаболитов растений разного возраста [47, 48] или органов в процессе развития [49] существенно различаются. Как правило, на ранних стадиях развития растений, органов и культур имеет место увеличение сопряжений с высокой синтетической активностью. Например, активно делящиеся клетки томатов в суспензионных культурах отличаются высоким уровнем потока углерода в синтез белка [21]. С высокой активностью синтеза белка связано высокое содержание свободных аминокислот, которое наблюдается на более ранних стадиях развития растений [50].

Синтетическая активность должна поддерживаться соответствующими ресурсами. Поскольку источником углерода и энергии для гетеротрофной культуры являются сахара, важную роль в обеспечении клетки приобретают пути их метаболизма. Моделирование потоков в гетеротрофных клетках арабидопсиса показало, что именно гликолиз и ЦТК играют ведущую роль в утилизации глюкозы [51]. Высокую значимость гликолизу может придать сочетание высокого уровня фосфорилированных гексоз и низкого соотношения АТФ/АДФ. Такая картина наблюдается, например, в период пролиферации клеток перикарпа плодов томатов [52]. Аналогично и в случае нашего исследования: в суспензионных культурах все фосфаты сахаров характеризовались большим содержанием в период роста. Падение уровня фосфатов сахаров при старении свидетельствует о снижении уровня активности начальных реакций гликолиза. Окончание пролиферации гетеротрофных клеток томата в культуре совпало с падением потоков через гликолиз и ЦТК [21]. Показано, что по мере старения гетеротрофных культур клеток табака активность аэробного дыхания снижается [20]. Предположительно, это является результатом углеродного голодания. Падение уровня дыхания, сопряженное со снижением содержания фосфорилированных сахаров, наблюдалось ранее в голодающих культурах после удаления субстрата из среды [14, 15]. В то же время высокий уровень сахарозы в клетках старых культур можно объяснить ее накоплением, как основного осмотика, в центральной вакуоли, объем которой увеличивается в процессе роста клеток [53]. Накопление свободных сахаров наблюдается на поздних стадиях развития растений и органов [50, 54]. Рост вакуоли также, вероятно, связан и с увеличением пула малата, который обычно накапливается в значительных количествах именно в этом компартменте [55, 56]. Накопление малата и других карбоксилатов может быть опосредовано частичным окислением сахаров для снабжения энергией [57], как и рост уровня пирувата, конечного продукта гликолиза.

По результатам анализа обогащения можно высказать предположение, что при старении активируется метаболизм аскорбата, как результат развития окислительного стресса в стареющих культурах. Высокая плотность культуры и истощение нутриентов в среде могут выступать в роли стрессовых факторов. А снижение уровня дыхания на поздних стадиях развития может рассматриваться в качестве механизма снижения окислительного стресса и замедления процесса старения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, следует заметить, что клетки стареющих гетеротрофных культур испытывают стресс, связанный с углеродным голоданием и изменениями состава среды. Полученные метаболомные данные свидетельствуют о том, что старение сопряжено с падением уровня синтетических процессов, снижением активности начальной части гликолиза, накоплением сложных сахаров, пентоз и карбоксилатов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. Исследования выполнены на оборудовании Ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Авторы выражают признательность проф. E. Zažímalová за предоставление культуры клеток табака, а также канд. биол. наук Т. Chen за помощь в проведении данного исследования.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Р.К. Пузанский — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, хроматографическое исследование, анализ полученных данных, написание текста, привлечение финансирования; А.А. Кирпичникова — выращивание культуры, сбор и обработка материалов; А.Л. Шаварда — хроматографическое исследование, анализ полученных данных; В.В. Емельянов — сбор и обработка материалов, внесение окончательной правки; М.Ф. Шишова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста, внесение окончательной правки.

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00393, <https://rscf.ru/project/23-24-00393/>).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgments. The research was performed using equipment of the Research Park “Center for Molecular and Cell Technologies” at Saint Petersburg State University. Authors thank Prof. E. Zažímalová for providing the tobacco cell culture, as well

as Dr. T. Chen for his assistance in carrying out this investigation.

Authors' contribution. All authors have made a significant contribution to the development of the concept, research, and preparation of the article, as well as read and approved the final version before its publication. Personal contribution of the authors: R.K. Puzanskiy — experimental design, collecting and preparation of samples, GC-MS, data analysis, writing the main part of the text, making final edits, funding acquisition; A.A. Kirpichnikova — maintaining cell

cultures, collecting and preparation of samples; A.L. Shavarda — GC-MS, data analysis; V.V. Yemelyanov — collecting and preparation of samples, making final edits; M.F. Shishova — experimental design, data analysis, writing the main part of the text, making final edits.

Funding source. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 23-24-00393, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00393/>).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Imseng N., Schillberg S., Schürch C., et al. Suspension culture of plant cells under heterotrophic conditions. В кн.: Meyer H., Schmidhalter D.R., editors. Industrial scale suspension culture of living cells. 1st edition. Wiley, 2014. P. 224–258. doi: 10.1002/9783527683321.ch07
2. Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. An introduction to plant cell culture: back to the future. В кн.: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F., editors. Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology™. Vol. 318. Humana Press, 2005. P. 3–8. doi: 10.1385/1-59259-959-1:003
3. Mhlongo M.I., Steenkamp P.A., Pieter L.A., et al. Profiling of altered metabolomic states in *Nicotiana tabacum* cells induced by priming agents // Front Plant Sci. 2016. Vol. 7. ID 1527. doi: 10.3389/fpls.2016.01527
4. Kariya K., Tsuchiya Y., Sasaki T., Yamamoto Y. Aluminium-induced cell death requires upregulation of *NtVPE1* gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // J Inorg Biochem. 2018. Vol. 181. P. 152–161. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.008
5. Bapat V.A., Kavi Kishor P.B., Jalaja N., et al. Plant cell cultures: Biofactories for the production of bioactive compounds // Agronomy. 2023. Vol. 13, N. 3. ID 858. doi: 10.3390/agronomy13030858
6. Zagorskaya A.A., Deineko E.V. Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins // Russian Journal Plant Physiology. 2017. Vol. 64, N. 6. P. 795–807. doi: 10.1134/S102144371705017X
7. Roitsch T., Sinha A.K. Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science // Photosynth. 2002. Vol. 40, N. 4. P. 481–492. doi: 10.1023/A:1024332430494
8. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can J Bot. 1972. Vol. 50, N. 1. P. 199–204. doi: 10.1139/b72-026
9. Dominguez P.G., Niittylä T. Mobile forms of carbon in trees: metabolism and transport // Tree Physiol. 2022. Vol. 42, N. 3. P. 458–487. doi: 10.1093/treephys/tpab123
10. Ruan Y.L. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling // Annu Rev Plant Biol. 2014. Vol. 65. P. 33–67. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251
11. Contento A.L., Kim S.-J., Bassham D.C. Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation // Plant Physiol. 2004. Vol. 135, N. 4. P. 2330–2347. doi: 10.1104/pp.104.044362
12. Jourmet E.P., Bligny R., Douce R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells // J Biol Chem. 1986. Vol. 261, N. 7. P. 3193–3199. doi: 10.1016/S0021-9258(17)35767-8
13. Wang H.-J., Wan A.-R., Hsu C.-M., et al. Transcriptomic adaptations in rice suspension cells under sucrose starvation // Plant Mol Biol. 2007. Vol. 63, N. 4. P. 441–463. doi: 10.1007/s11103-006-9100-4
14. Gout E., Bligny R., Douce R., et al. Early response of plant cell to carbon deprivation: *in vivo* ³¹P-NMR spectroscopy shows a quasi-instantaneous disruption on cytosolic sugars, phosphorylated intermediates of energy metabolism, phosphate partitioning, and intracellular pHs // New Phytol. 2011. Vol. 189, N. 1. P. 135–147. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03449.x
15. Roby C., Martin J.-B., Bligny R., Douce R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies // J Biol Chem. 1987. Vol. 262, N. 11. P. 5000–5007. doi: 10.1016/S0021-9258(18)61145-7
16. Inoue Y., Moriyasu Y. Degradation of membrane phospholipids in plant cells cultured in sucrose-free medium // Autophagy. 2006. Vol. 2, N. 3. P. 244–246. doi: 10.4161/autophagy.2745
17. Kim S.W., Koo B.C., Kim J., Liu J.R. Metabolic discrimination of sucrose starvation from *Arabidopsis* cell suspension by ¹H NMR based metabolomics // Biotechnol Bioprocess Eng. 2007. Vol. 12, N. 6. P. 653–661. doi: 10.1007/BF02931082
18. Binder S. Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana* // The Arabidopsis Book. 2010. Vol. 2010, N. 8. ID e0137. doi: 10.1199/tab.0137
19. Morkunas I., Borek S., Formela M., Ratajczak L. Plant responses to sugar starvation. В кн.: Chang C.F., editor. Carbohydrates — comprehensive studies on glycobiology and glycotecology. InTech, 2012. doi: 10.5772/51569
20. Tsuchiya Y., Nakamura T., Izumi Y., et al. Physiological role of aerobic fermentation constitutively expressed in an aluminum-tolerant cell line of tobacco (*Nicotiana tabacum*) // Plant Cell Physiol. 2021. Vol. 62, N. 9. P. 1460–1477. doi: 10.1093/pcp/pcab098
21. Rontein D., Dieuaide-Noubhani M., Dufourc E.J., et al. The metabolic architecture of plant cells // J Biol Chem. 2002. Vol. 277, N. 46. P. 43948–43960. doi: 10.1074/jbc.M206366200
22. Peč J., Flores-Sanchez I.J., Choi Y.H., Verpoorte R. Metabolic analysis of elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. by ¹H-NMR spectroscopy // Biotechnol Lett. 2010. Vol. 32, N. 7. P. 935–941. doi: 10.1007/s10529-010-0225-9
23. Toyooka K., Sato M., Wakazaki M., Matsuoka K. Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells // Plant Signal Behav. 2016. Vol. 11, N. 3. ID e1149669. doi: 10.1080/15592324.2016.1149669
24. Toyooka K., Sato M., Kutsuna N., et al. Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells // Plant Cell Physiol. 2014. Vol. 55, N. 9. P. 1544–1555. doi: 10.1093/pcp/pcu084

25. Voitsekhovskaja O.V., Schiermeyer A., Reumann S. Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells // *Front Plant Sci.* 2014. Vol. 5. ID 629. doi: 10.3389/fpls.2014.00629
26. Zhao Z., Zhang J.-W., Lu S.-H., et al. Transcriptome divergence between developmental senescence and premature senescence in *Nicotiana tabacum* L. // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, N. 1. ID 20556. doi: 10.1038/s41598-020-77395-2
27. Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2005. Vol. 42, N. 4. P. 567–585. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02399.x
28. Noor E., Eden E., Milo R., Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy // *Mol Cell.* 2010. Vol. 39, N. 5. P. 809–820. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.031
29. Zakhartsev M., Medvedeva I., Orlov Y., et al. Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing *Arabidopsis thaliana* in relation to sucrose translocation // *BMC Plant Biol.* 2016. Vol. 16, N. 1. ID262. doi: 10.1186/s12870-016-0868-3
30. Fiehn O. Metabolomics by Gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling // *Curr Prot Molecul Biol.* 2016. Vol. 114, N. 1. P. 30.4.1–30.4.32. doi: 10.1002/0471142727.mb3004s114
31. Zažimalová E., Petrášek J., Morris D.A. The dynamics of auxin transport in tobacco cells // *Bulg J Plant Physiol.* 2003. N. S. P. 207–224.
32. Campanoni P., Blasius B., Nick P. Auxin transport synchronizes the pattern of cell division in a tobacco cell line // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, N. 3. P. 1251–1260. doi: 10.1104/pp.103.027953
33. Zažimalová E., Opatrný Z., Březinová A., Eder J. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content // *J Exp Bot.* 1995. Vol. 46, N. 9. P. 1205–1213. doi: 10.1093/jxb/46.9.1205
34. Johnsen L.G., Skou P.B., Khakimov B., Bro R. Gas chromatography–mass spectrometry data processing made easy // *J Chromatogr A.* 2017. Vol. 1503. P. 57–64. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.052
35. Hummel J., Selbig J., Walthert D., Kopka J. The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. В кн.: Nielsen J., Jewett M.C., editors. *Metabolomics. Topics in Current Genetics.* Vol. 18. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. P. 75–95. doi: 10.1007/4735_2007_0229
36. Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B., Chu G. *impute: impute*: Imputation for microarray data // *Bioconductor.* 2023. R package version 1.76.0. doi: 10.18129/B9.bioc.impute
37. Stacklies W., Redestig H., Scholz M., et al. *pcaMethods* — a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data // *Bioinformatics.* 2007. Vol. 23, N. 9. P. 1164–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/btm069
38. Thévenot E.A., Roux A., Xu Y., et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses // *J Proteome Res.* 2015. Vol. 14, N. 8. P. 3322–3335. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
39. Korotkevich G., Sukhov V., Budin N., et al. Fast gene set enrichment analysis // *BioRxiv.* 2021. ID60012. doi: 10.1101/060012
40. Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y., et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes // *Nucleic Acids Res.* 2023. Vol. 51, N. D1. P. D587–D592. doi: 10.1093/nar/gkac963
41. Tenenbaum D., Maintainer B. KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) // *Bioconductor.* 2022. R package version 1.36.2. doi: 10.18129/B9.bioc.KEGGREST
42. Shannon P., Markiel A., Ozier O., et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // *Genome Res.* 2003. Vol. 13, N. 11. P. 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
43. Yemelyanov V.V., Puzanskiy R.K., Burlakovskiy M.S., et al. Metabolic profiling of transgenic tobacco plants synthesizing bovine interferon-gamma. В кн.: Zhan X., editor. *Metabolomics — methodology and applications in medical sciences and life sciences.* IntechOpen, 2021. doi: 10.5772/intechopen.96862
44. Li D., Heiling S., Baldwin I.T., Gaquerel E. Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory // *PNAS USA.* 2016. Vol. 113, N. 47. P. E7610–E7618. doi: 10.1073/pnas.1610218113
45. Bartnik M., Facey P.C. Glycosides. В кн.: Badal S., Delgado R., editors. *Pharmacognosy.* Elsevier, 2017. P. 101–161. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1
46. Tugizimana F., Steenkamp P.A., Piater L.A., Dubery I.A. Multi-platform metabolomic analyses of ergosterol-induced dynamic changes in *Nicotiana tabacum* cells // *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, N. 1. ID e87846. doi: 10.1371/journal.pone.0087846
47. Petrova N.V., Sazanova K.V., Medvedeva N.A., Shavarda A.L. Features of metabolomic profiles in different stages of ontogenesis in *Prunella vulgaris* (*Lamiaceae*) grown in a climate chamber // *Russian Journal Bioorganic Chemistry.* 2019. Vol. 45, N. 7. P. 906–912. doi: 10.1134/S1068162019070100
48. Yurkov A.P., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., et al. Mycorrhiza-induced alterations in metabolome of *Medicago lupulina* leaves during symbiosis development // *Plants.* 2021. Vol. 10, N. 11. ID 2506. doi: 10.3390/plants10112506
49. Liu Y., Li M., Xu J., et al. Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low-nitrogen conditions // *BMC Plant Biol.* 2019. Vol. 19, N. 1. ID389. doi: 10.1186/s12870-019-2005-6
50. Shtark O.Y., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., et al. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development // *PeerJ.* 2019. Vol. 7. ID e7495. doi: 10.7717/peerj.7495
51. Smith E.N., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. Isotopically non-stationary metabolic flux analysis of heterotrophic *Arabidopsis thaliana* cell cultures // *Front Plant Sci.* 2023. Vol. 13. ID1049559. doi: 10.3389/fpls.2022.1049559
52. Shameer S., Vallarino J.G., Fernie A.R., et al. Flux balance analysis of metabolism during growth by osmotic cell expansion and its application to tomato fruits // *Plant J.* 2020. Vol. 103, N. 1. P. 68–82. doi: 10.1111/tpj.14707
53. Shameer S., Vallarino J.G., Fernie A.R., et al. Predicting metabolism during growth by osmotic cell expansion // *BiolRxiv.* 2019. ID 731232. doi: 10.1101/731232
54. Li W., Zhang H., Li X., et al. Intergrative metabolomic and transcriptomic analyses unveil nutrient remobilization events in leaf senescence of tobacco // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, N. 1. ID 12126. doi: 10.1038/s41598-017-11615-0
55. Tohge T., Ramos M.S., Nunes-Nesi A., et al. Toward the storage metabolome: Profiling the barley vacuole // *Plant Physiol.* 2011. Vol. 157, N. 3. P. 1469–1482. doi: 10.1104/pp.111.185710

56. Ohnishi M., Anegawa A., Sugiyama Y., et al. Molecular components of *Arabidopsis* intact vacuoles clarified with metabolomic and proteomic analyses // *Plant Cell Physiol.* 2018. Vol. 59, N. 7. P. 1353–1362. doi: 10.1093/pcp/pcy069

57. Beauvoit B.P., Colombié S., Monier A., et al. Model-assisted analysis of sugar metabolism throughout tomato fruit development reveals enzyme and carrier properties in relation to vacuole expansion // *Plant Cell.* 2014. Vol. 26, N. 8. P. 3224–3242. doi: 10.1105/tpc.114.127761

REFERENCES

1. Imseng N, Schillberg S, Schürch C, et al. Suspension culture of plant cells under heterotrophic conditions. In: Meyer H, Schmidhalter DR, editors. *Industrial scale suspension culture of living cells. 1st edition.* Wiley, 2014. P. 224–258. doi: 10.1002/9783527683321.ch07
2. Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F. An introduction to plant cell culture: back to the future. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F, editors. *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology™.* Vol. 318. Humana Press, 2005. P. 3–8. doi: 10.1385/1-59259-959-1:003
3. Mhlongo MI, Steenkamp PA, Piater LA, et al. Profiling of altered metabolomic states in *Nicotiana tabacum* cells induced by priming agents. *Front Plant Sci.* 2016;7:1527. doi: 10.3389/fpls.2016.01527
4. Kariya K, Tsuchiya Y, Sasaki T, Yamamoto Y. Aluminium-induced cell death requires upregulation of *NtVPE1* gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J Inorg Biochem.* 2018;181:152–161. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.008
5. Bapat VA, Kavi Kishor PB, Jalaja N, et al. Plant cell cultures: Biofactories for the production of bioactive compounds. *Agronomy.* 2023;13(3):858. doi: 10.3390/agronomy13030858
6. Zagorskaya AA, Deineko EV. Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins. *Russian Journal Plant Physiology.* 2017;64(6):795–807. doi: 10.1134/S102144371705017X
7. Roitsch T, Sinha AK. Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science. *Photosynth.* 2002;40(4):481–492. doi: 10.1023/A:1024332430494
8. Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot.* 1972;50(1):199–204. doi: 10.1139/b72-026
9. Dominguez PG, Niittylä T. Mobile forms of carbon in trees: metabolism and transport. *Tree Physiol.* 2022;42(3):458–487. doi: 10.1093/treephys/tpab123
10. Ruan YL. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65:33–67. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251
11. Contento AL, Kim S-J, Bassham DC. Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol.* 2004;135(4):2330–2347. doi: 10.1104/pp.104.044362
12. Journet EP, Bligny R, Douce R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J Biol Chem.* 1986;261(7):3193–3199. doi: 10.1016/S0021-9258(17)35767-8
13. Wang H-J, Wan A-R, Hsu C-M, et al. Transcriptomic adaptations in rice suspension cells under sucrose starvation. *Plant Mol Biol.* 2007;63(4):441–463. doi: 10.1007/s11103-006-9100-4
14. Gout E, Bligny R, Douce R, et al. Early response of plant cell to carbon deprivation: *in vivo* ³¹P-NMR spectroscopy shows a quasi-instantaneous disruption on cytosolic sugars, phosphorylated intermediates of energy metabolism, phosphate partitioning, and intracellular pHs. *New Phytol.* 2011;189(1):135–147. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03449.x
15. Roby C, Martin J-B, Bligny R, Douce R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *J Biol Chem.* 1987;262(11):5000–5007. doi: 10.1016/S0021-9258(18)61145-7
16. Inoue Y, Moriyasu Y. Degradation of membrane phospholipids in plant cells cultured in sucrose-free medium. *Autophagy.* 2006;2(3):244–246. doi: 10.4161/auto.2745
17. Kim SW, Koo BC, Kim J, Liu JR. Metabolic discrimination of sucrose starvation from *Arabidopsis* cell suspension by ¹H NMR based metabolomics. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2007;12(6):653–661. doi: 10.1007/BF02931082
18. Binder S. Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book.* 2010;2010(8): e0137. doi: 10.1199/tab.0137
19. Morkunas I, Borek S, Formela M, Ratajczak L. Plant responses to sugar starvation. In: Chang CF, editor. *Carbohydrates — comprehensive studies on glycobiology and glycotecology.* InTech, 2012. doi: 10.5772/51569
20. Tsuchiya Y, Nakamura T, Izumi Y, et al. Physiological role of aerobic fermentation constitutively expressed in an aluminum-tolerant cell line of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Cell Physiol.* 2021;62(9):1460–1477. doi: 10.1093/pcp/pcab098
21. Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, et al. The metabolic architecture of plant cells. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43948–43960. doi: 10.1074/jbc.M206366200
22. Peč J, Flores-Sanchez IJ, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic analysis of elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. by ¹H-NMR spectroscopy. *Biotechnol Lett.* 2010;32(7):935–941. doi: 10.1007/s10529-010-0225-9
23. Toyooka K, Sato M, Wakazaki M, Matsuoka K. Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Signal Behav.* 2016;11(3): e1149669. doi: 10.1080/15592324.2016.1149669
24. Toyooka K, Sato M, Kutsuna N, et al. Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 2014;55(9):1544–1555. doi: 10.1093/pcp/pcu084
25. Voitsekhovskaja OV, Schiermeyer A, Reumann S. Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *Front Plant Sci.* 2014;5:629. doi: 10.3389/fpls.2014.00629
26. Zhao Z, Zhang J-W, Lu S-H, et al. Transcriptome divergence between developmental senescence and premature senescence in *Nicotiana tabacum* L. *Sci Rep.* 2020;10(1):20556. doi: 10.1038/s41598-020-77395-2
27. Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental

- and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2005;42(4):567–585. doi: 10.1111/j.1365–313X.2005.02399.x
28. Noor E, Eden E, Milo R, Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol Cell*. 2010;39(5):809–820. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.031
29. Zakhartsev M, Medvedeva I, Orlov Y, et al. Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing *Arabidopsis thaliana* in relation to sucrose translocation. *BMC Plant Biol*. 2016;16(1):262. doi: 10.1186/s12870-016-0868-3
30. Fiehn O. Metabolomics by Gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Curr Prot Mol Biol*. 2016;114(1):30.4.1–30.4.32. doi: 10.1002/0471142727.mb3004s114
31. Zažímalová E, Petrášek J, Morris DA. The dynamics of auxin transport in tobacco cells. *Bulg J Plant Physiol*. 2003;(S):207–224.
32. Campanoni P, Blasius B, Nick P. Auxin transport synchronizes the pattern of cell division in a tobacco cell line. *Plant Physiol*. 2003;133(3):1251–1260. doi: 10.1104/pp.103.027953
33. Zažímalová E, Opatrný Z, Březinová A, Eder J. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content. *J Exp Bot*. 1995;46(9):1205–1213. doi: 10.1093/jxb/46.9.1205
34. Johnsen LG, Skou PB, Khakimov B, Bro R. Gas chromatography — mass spectrometry data processing made easy. *J Chromatogr A*. 2017;1503:57–64. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.052
35. Hummel J, Selbig J, Walther D, Kopka J. The Golm Metabolome Database: a database for GC–MS based metabolite profiling. In: Nielsen J, Jewett MC, editors. *Metabolomics. Topics in Current Genetics. Vol. 18*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. P. 75–95. doi: 10.1007/4735_2007_0229
36. Hastie T, Tibshirani R, Narasimhan B, Chu G. *impute: impute*: Imputation for microarray data. *Bioconductor*. 2023; R package version 1.76.0. doi: 10.18129/B9.bioc.impute
37. Stacklies W, Redestig H, Scholz M, et al. *pcaMethods* — a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics*. 2007;23(9):1164–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/btm069
38. Thévenot EA, Roux A, Xu Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J Proteome Res*. 2015;14(8):3322–3335. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
39. Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, et al. Fast gene set enrichment analysis. *BioRxiv*. 2021;60012. doi: 10.1101/060012
40. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D587–D592. doi: 10.1093/nar/gkac963
41. Tenenbaum D, Maintainer B. KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG). *Bioconductor*. 2022; R package version 1.36.2. doi: 10.18129/B9.bioc.KEGGREST
42. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
43. Yemelyanov VV, Puzanskiy RK, Burlakovskiy MS, et al. Metabolic profiling of transgenic tobacco plants synthesizing bovine interferon-gamma. In: Zhan X, editor. *Metabolomics — methodology and applications in medical sciences and life sciences*. IntechOpen, 2021. doi: 10.5772/intechopen.96862
44. Li D, Heiling S, Baldwin IT, Gaquerel E. Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory. *PNAS USA*. 2016;113(47):E7610–E7618. doi: 10.1073/pnas.1610218113
45. Bartnik M, Facey PC. Glycosides. In: Badal S, Delgado R, editors. *Pharmacognosy*. Elsevier, 2017. P. 101–161. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1
46. Tugizimana F, Steenkamp PA, Piater LA, Dubery IA. Multi-platform metabolomic analyses of ergosterol-induced dynamic changes in *Nicotiana tabacum* cells. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e87846. doi: 10.1371/journal.pone.0087846
47. Petrova NV, Sazanova KV, Medvedeva NA, Shavarda AL. Features of metabolomic profiles in different stages of ontogenesis in *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) grown in a climate chamber. *Russian Journal Bioorganic Chemistry*. 2019;45(7):906–912. doi: 10.1134/S1068162019070100
48. Yurkov AP, Puzanskiy RK, Avdeeva GS, et al. Mycorrhiza-induced alterations in metabolome of *Medicago lupulina* leaves during symbiosis development. *Plants*. 2021;10(11):2506. doi: 10.3390/plants10112506
49. Liu Y, Li M, Xu J, et al. Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low-nitrogen conditions. *BMC Plant Biol*. 2019;19(1):389. doi: 10.1186/s12870-019-2005-6
50. Shtark OY, Puzanskiy RK, Avdeeva GS, et al. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development. *PeerJ*. 2019;7:e7495. doi: 10.7717/peerj.7495
51. Smith EN, Ratcliffe RG, Kruger NJ. Isotopically non-stationary metabolic flux analysis of heterotrophic *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Front Plant Sci*. 2023;13:1049559. doi: 10.3389/fpls.2022.1049559
52. Shameer S, Vallarino JG, Fernie AR, et al. Flux balance analysis of metabolism during growth by osmotic cell expansion and its application to tomato fruits. *Plant J*. 2020;103(1):68–82. doi: 10.1111/tpj.14707
53. Shameer S, Vallarino JG, Fernie AR, et al. Predicting metabolism during growth by osmotic cell expansion. *BiolRxiv*. 2019;731232. doi: 10.1101/731232
54. Li W, Zhang H, Li X, et al. Integrative metabolomic and transcriptomic analyses unveil nutrient remobilization events in leaf senescence of tobacco. *Sci Rep*. 2017;7(1):12126. doi: 10.1038/s41598-017-11615-0
55. Tohge T, Ramos MS, Nunes-Nesi A, et al. Toward the storage metabolome: Profiling the barley vacuole. *Plant Physiol*. 2011;157(3):1469–1482. doi: 10.1104/pp.111.185710
56. Ohnishi M, Anegawa A, Sugiyama Y, et al. Molecular components of *Arabidopsis* intact vacuoles clarified with metabolomic and proteomic analyses. *Plant Cell Physiol*. 2018;59(7):1353–1362. doi: 10.1093/pcp/pcy069
57. Beauvoit BP, Colombié S, Monier A, et al. Model-assisted analysis of sugar metabolism throughout tomato fruit development reveals enzyme and carrier properties in relation to vacuole expansion. *Plant Cell*. 2014;26(8):3224–3242. doi: 10.1105/tpc.114.127761

ОБ АВТОРАХ

Роман Константинович Пузанский, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-5862-2676; eLibrary SPIN: 6399-2016;
e-mail: puzansky@yandex.ru

Анастасия Алексеевна Кирпичникова;
ORCID: 0000-0001-5133-5175; eLibrary SPIN: 9960-9527;
e-mail: nastin1972@mail.ru

Алексей Леонидович Шаварда, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-1778-2814; eLibrary SPIN: 5637-5122;
e-mail: stachyopsis@gmail.com

Владислав Владимирович Емельянов, канд. биол. наук,
доцент; ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278;
e-mail: bootika@mail.ru

***Мария Федоровна Шишова**, д-р биол. наук, профессор;
адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб.,
д. 7/9; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611;
e-mail: mshishova@mail.ru

AUTHORS' INFO

Roman K. Puzanskiy, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-5862-2676; eLibrary SPIN: 6399-2016;
e-mail: puzansky@yandex.ru

Anastasiia A. Kirpichnikova;
ORCID: 0000-0001-5133-5175; eLibrary SPIN: 9960-9527;
e-mail: nastin1972@mail.ru

Alexey L. Shavarda, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-1778-2814; eLibrary SPIN: 5637-5122;
e-mail: stachyopsis@gmail.com

Vladislav V. Yemelyanov, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;
ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278;
e-mail: bootika@mail.ru

***Maria F. Shishova**, Dr. Sci. (Biology), Professor;
address; 7/9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034,
Russia; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611;
e-mail: mshishova@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author