

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 3, 2024

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Фоторегулируемые на уровне направляющей РНК системы CRISPR/Cas <i>Л.В. Саковина, Е.С. Горленко, Д.С. Новопашина</i>	421
Влияние генистеина на структуру нуклеосом и образование комплексов с PARP1 <i>Т.В. Андреева, А.В. Ефременко, А.В. Феофанов, А.В. Любителев, А.Н. Коровина, В.М. Студитский, Н.В. Малюченко</i>	432
Воздействие тория-232 на биолюминесцентную ферментативную систему и радиопротекторная активность гуминовых веществ <i>Т.В. Рожко, О.В. Колесник, А.С. Сачкова, Н.Ю. Романова, Д. И. Стом, Н.С. Кудряшева</i>	444
Влияние вязких сред на квантовый выход биолюминесценции в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой <i>А.Е. Лисица, Л.А. Суковатый, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева</i>	455

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Участие карбоангидраз хлоропластов высших С3-растений в адаптационных изменениях фотосинтетических реакций <i>Б.Н. Иванов, Н.Н. Руденко</i>	466
Адаптация первичных реакций фотосинтеза в клетках <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> к действию кадмия: анализ гетерогенности популяции <i>А.А. Волгушева, И.В. Конюхов, Т.К. Антал</i>	478
Оценка гетерогенности антенны и активности кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II математическими методами <i>Н.С. Дегтерева, Т.Ю. Плюснина, С.С. Хрущев, Р.Н. Червицов, Е.Н. Воронова, О.В. Яковлева, Т.К. Антал, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин</i>	486
Фотохимическое преобразование энергии дальнего красного света в реакционных центрах фотосистемы I из цианобактерии <i>Acarochloris marina</i> <i>А.А. Петрова, А.Р. Casazza, S. Santabarbara, Д.А. Черепанов</i>	498
Влияние катионных антисептиков на спектральные характеристики и транспорт электрона в изолированных фотосинтетических комплексах фотосистем I и II <i>В.З. Пащенко, Е.П. Лукашев, М.Д. Мамедов, Д.А. Гвоздев, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс, М.Г. Страховская</i>	515
Антиоксидантные свойства растительного пластохинона <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> <i>Д.В. Ветошкина, А.А. Николаев, М.М. Борисова-Мубаракшина</i>	527
Исследование влияния физико-химических факторов на частоту трансдукции плазмид бактериофагом RB49 <i>А.Н. Никулина, Н.А. Никулин, А.А. Зимин</i>	544
Эффекты кофейной кислоты, гиспидина и обнаруженного стимулирующего компонента на свечение мицелия и люминесцентной системы базидиомицета <i>Neonothopanus nambi</i> <i>Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, В.М. Ле, О.А. Могильная, Ю.В. Захарова, А.С. Сухих, В.С. Бондарь</i>	557
Биолюминесцентная тест-система на основе рекомбинантной люциферазы светляка <i>L. mingrelica</i> для изучения эффективности действия гентамицина на живые клетки <i>E. coli</i> <i>Г.Ю. Ломакина, С.С. Каминская, Н.Н. Угарова</i>	565

Блокаторы потенциал-зависимых натриевых каналов на основе азобензола с управляемой светом местноанестетической и антиаритмической активностью

А.Н. Ноев, С.Г. Коваленко, Э.Д. Гатаулина, Е.А. Турчанинова, В.Д. Джабраилов, А.А. Аитова, Д.А. Лихобабина, Ж.А. Сутемьева, Ш.Р. Фролова, Л.Э. Руппель, Д.А. Минаков, Н.В. Суворов, П.В. Островерхов, Ю.Л. Васильев, М.В. Николаев, В.А. Цвеляя, К.И. Агладзе, М.А. Грин 574

Уникальные особенности люминесцентного гриба *Muscena gombakensis*

А.П. Пузырь, Е.Д. Посохина, А.А. Тимофеев, А.Е. Буров, С.Е. Медведева, И.Н. Павлов 594

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Измерения фотохимического индекса отражения как инструмент дистанционного мониторинга фотосинтетических параметров растений

Ю.А. Золин, Е.М. Сухова, В.С. Сухов 603

Влияние комбинации локального умеренного нагрева и освещения на показатели водного обмена интактных частей пшеницы, измеренные тепловизионным методом

А.Ю. Попова, Ю.А. Золин, В.С. Сухов, Е.М. Сухова, Л.М. Юдина 615

Подводные измерения спектров проходящего света в стратифицированных водоемах беломорского побережья как ключ к пониманию пигментного состава фототрофов в зоне хемоклина

Е.А. Лабунская, Д.А. Воронов, В.И. Лобышев, Е.Д. Краснова 627

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Кинетика длительной люминесценции эритрозина в тканях молочной железы *in vitro*

С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, М.А. Сеньчукова 647

Комбинированная фотодинамическая и плазмонная фототермическая терапия в модели крыс с перевитыми опухолями

А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, Г.Н. Маслякова, Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов, В.Д. Генин, Э.А. Генина, В.В. Тучин 656

Влияние компонентного состава слюны на направленность биферментного биoluminesцентного анализа в зависимости от вида физической нагрузки

В.В. Мальшева, Л.В. Степанова, А.М. Выshedко, Л.В. Бельская, Е.А. Сарф, З. Халджанова, О.А. Коленчукова, В.А. Кратасюк 664

Применение биoluminesцентного ферментативного биотеста для анализа слюны работников железнодорожного транспорта с целью мониторинга функционального состояния организма в условиях трудовой деятельности

Л.В. Степанова, О.А. Коленчукова, Г.В. Жукова, О.С. Сутормин, В.А. Кратасюк 674

ХРОНИКА

Фотобиология в России

А.А. Цыганков, М.М. Борисова-Мубаракшина, Е.С. Высоцкий, А.Е. Соловченко, Н.В. Суворов, В.В. Тучин 684

Contents

Vol. 69, No. 3, 2024

Molecular Biophysics

- CRISPR/Cas System Photocontrolled at the Guide RNA Level
L.V. Sakovina, E.S. Gorlenko, and D.S. Novopashina 421
- Influence of Genistein on the Structure of Nucleosomes and Formation of Complexes With PARP1
T.V. Andreeva, A.V. Efremenko, A.V. Feofanov, A.V. Lyubitelev, A.N. Korovina, V.M. Studitsky, N.V. Malyuchenko 432
- Effects of Thorium-232 on the Bioluminescent Enzymatic System and Radioprotective Activity of Humic Substances
T.V. Rozhko, O.V. Kolesnik, A.S. Sachkova, N. Yu. Romanova, D. I. Stom, and N.S. Kudryasheva 444
- Effect of Viscous Media on the Quantum Yield of Bioluminescence in a Reaction Catalyzed by Bacterial Luciferase
A.E. Lisitsa, L.A. Sukovaty, V.A. Kratasyuk, and E.V. Nemtseva 455

Cell Biophysics

- The Involvement of Carbonic Anhydrases in Chloroplasts of C3 Higher Plants in Adaptation Changes of Photosynthetic Reactions
B.N. Ivanov and N.N. Rudenko 466
- Acclimation of Primary Photosynthetic Reactions in the Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* to Cadmium: Analysis of Cell Population Heterogeneity
A.A. Volgusheva, I.V. Konyukhov, and T.K. Antal 478
- Assessment of Antenna Heterogeneity and Activity of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II Using Mathematical Methods
N.S. Degtereva, T.Yu. Plyusnina, S.S. Khrushchev, R.N. Chervitsov, E.N. Voronova, O.V. Yakovleva, T.K. Antal, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin 486
- Photochemical Energy Conversion of Far-Red Light in Photosystem I Reaction Centers from Cyanobacterium *Acaryochloris marina*
A.A. Petrova, A. P. Casazza, S. Santabarbara, and D.A. Cherepanov 498
- The Effect of Cationic Antiseptics on Spectral Characteristics and Electron Transport in Isolated Photosynthetic Complexes of Photosystems I and II
V.Z. Pashchenko, E.P. Lukashev, M.D. Mamedov, D.A. Gvozdev, B.N. Korvatovsky, P.P. Knox, and M.G. Strahovskaya 515
- Antioxidant Properties of Plant Plastoquinone *in vivo* and *in vitro*
D.V. Vetoshkina, A.A. Nikolaev, and M.M. Borisova-Mubarakshina 527
- Study of the Influence of Physicochemical Factors on Frequency of Plasmid Transduction by Bacteriophage RB49
A.N. Nikulina, N.A. Nikulin, and A.A. Zimin 544
- Effects of Caffeic Acid, Hispidin and the Discovered Stimulating Component on Luminescence of Mycelium and a Luminescent System of Basidiomycete *Neonothopanus nambi*
N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, V.M. Le, O.A. Mogilnaya, Yu.V. Zakharova, A.S. Sukhikh, and V.S. Bondar 557

Bioluminescent Test System Based on Recombinant <i>L. mingrelica</i> Firefly Luciferase as a Means of Investigating the Efficacy of Gentamicin Effect on <i>E. coli</i> Living Cells <i>G. Yu. Lomakina, S.S. Kaminskaya, and N.N. Ugarova</i>	565
Azobenzene-Based Voltage-Gated Sodium Channel Blockers with Light-Controlled Local Anesthetic and Antiarrhythmic Activity <i>A.N. Noev, S.G. Kovalenko, E.D. Gataulina, E.A. Turchaninova, V.D. Dzhabrailov, A.A. Aitova, D.A. Likhobabina, J.A. Sutevieva, S.R. Frolova, L.E. Ruppel, D.A. Minakov, N.V. Suvorov, P.V. Ostroverkhov, Yu.L. Vasil'ev, M.V. Nikolaev, V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze, and M.A. Grin</i>	574
Unique Features of the Luminescent Mushroom <i>Mycena gombakensis</i> <i>A.P. Puzyr, E.D. Posokhina, A.A. Timofeev, A.E. Burov, S.E. Medvedeva, and I.N. Pavlov</i>	594

Complex Systems Biophysics

Measurements of Photochemical Reflectance Index as a Tool for Remote Monitoring of Photosynthetic Parameters of Plants <i>Yu.A. Zolin, E.M. Sukhova, and V.S. Sukhov</i>	603
The Influence of a Combination of Local Moderate Heating and Lighting on the Indicators of Water Metabolism of Intact Parts of Wheat Based on Thermal Imaging <i>A. Yu. Popova, Yu.A. Zolin, V.S. Sukhov, E.M. Sukhova, and L.M. Yudina</i>	615
Underwater Measurements of Transmitted Light Spectra in Stratified Water Bodies on the White Sea Coast as a Key to the Understanding of Pigment Composition of Phototrophs in the Chemocline Zone <i>E.A. Labunskaya, D.A. Voronov, V.I. Lobyshev, and E.D. Krasnova</i>	627

Medical Biophysics

Long-Term Luminescence Kinetics of Erythrosine in Breast Tissue <i>in vitro</i> <i>S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, and M.A. Senchukova</i>	647
Photodynamic and Plasmonic Photothermal Combination Therapy in a Rat Model of Transplanted Tumors <i>A.B. Bucharskaya, N.A. Navolokin, D.A. Mudrak, G.N. Maslyakova, B.N. Khlebtsov, N.G. Khlebtsov, V.D. Genin, E.A. Genina, and V.V. Tuchin</i>	656
The Influence of Salivary Constituents on the Activity of Bioluminescent Double Enzyme-Based System Depending on the Type of Physical Exertion <i>V.V. Malysheva, L.V. Stepanova, A.M. Vyshedko, L.V. Bel'skaya, E.A. Sarf, Z. Khaljanova, O.A. Kolenchukova, and V.A. Kratasyuk</i>	664
The Use of the Bioluminescent Enzyme Bioassay for the Analysis of Saliva of Railway Transport Workers to Monitor the Functional State of the Body in the Conditions of Labor Activity <i>L.V. Stepanova, O.A. Kolenchukova, G.V. Zhukova, O.S. Sutormin, and V.A. Kratasyuk</i>	674

Cronicle

Photobiology in Russia <i>A.A. Tsygankov, M.M. Borisova-Mubarakshina, E.S. Vysotsky, A.E. Solovchenko, N.V. Suvorov, and V.V. Tuchin</i>	684
---	-----

ФОТОРЕГУЛИРУЕМЫЕ НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

© 2024 г. Л.В. Саковина*, **, Е.С. Горленко*, **, Д.С. Новопашина*, **, #

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
просп. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

**Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail: danov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

После доработки 17.01.2024 г.

Принята к публикации 21.02.2024 г.

Повышение эффективности и точности систем геномного редактирования является актуальной задачей современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Особый интерес вызывает создание регулируемых систем CRISPR/Cas, активностью которых можно управлять с использованием различных физико-химических стимулов, таких как облучение светом, изменение pH, температура, изменение концентраций определенных веществ и др. Многообещающим направлением в этой области является разработка подходов к регуляции активности на уровне направляющей РНК за счет введения фоточувствительных модификаций в структуру и последовательность направляющей РНК, а также вспомогательных олигонуклеотидов. Данный обзор посвящен анализу работ в области создания фоточувствительных направляющих РНК и их использования в системах редактирования генома CRISPR.

Ключевые слова: регулируемые системы CRISPR/Cas9, УФ-облучение, направляющая РНК, фоторасщепляемый линкер, фотоблокирующие олигонуклеотиды.

DOI: 10.31857/S0006302924030012, EDN: OGPSDR

Создание контролируемых молекулярно-биологических систем, в том числе систем геномного редактирования, является перспективным подходом к получению регулируемых в пространстве и времени инструментов, которые могут быть использованы в различных областях клеточной и молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии, агробиологии и биоорганической химии.

В настоящее время синтетические олигонуклеотиды широко применяются в молекулярной биологии и биохимии для регуляции таких фундаментальных биологических процессов, как транскрипция и трансляция. Фотоблокированные молекулы ДНК и РНК, содержащие в своей цепи фоточувствительные блокирующие группы или фоторасщепляемые линкеры, могут применяться для фоторегуляции экспрессии генов. Такой подход, основанный на использовании

фотолабильных групп, позволяет исследователям проводить эксперименты с высоким пространственно-временным разрешением, так как исключена возможность проявления биологической активности олигонуклеотида до момента облучения. Эта стратегия была успешно использована для контролируемой регуляции экспрессии генов с помощью фотоблокированных антисмысловых олигонуклеотидов [1], малых интерферирующих РНК [2, 3], микроРНК [4] и анти-микроРНК [5], для контролируемого редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas (CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов) [6, 7], а также в других областях молекулярной биологии и биохимии [8].

Открытие систем иммунитета бактерий, а именно CRISPR-систем, позволило создать уникальный инструмент геномного редактирования. В частности, система CRISPR/Cas9 в настоящее время является мощным инструментом редактирования генов *in vivo* [9–11]. Всего два компонента системы, нуклеаза Cas9 и единая направляющая РНК (sgРНК), формируют эффекторный

Сокращения: CRISPR – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), sgРНК – объединенная направляющая рибонуклеиновая кислота (single guide RNA), crРНК – CRISPR РНК, tracrРНК – транс-активирующая CRISPR РНК (trans-activating CRISPR RNA), УФ – ультрафиолетовый.

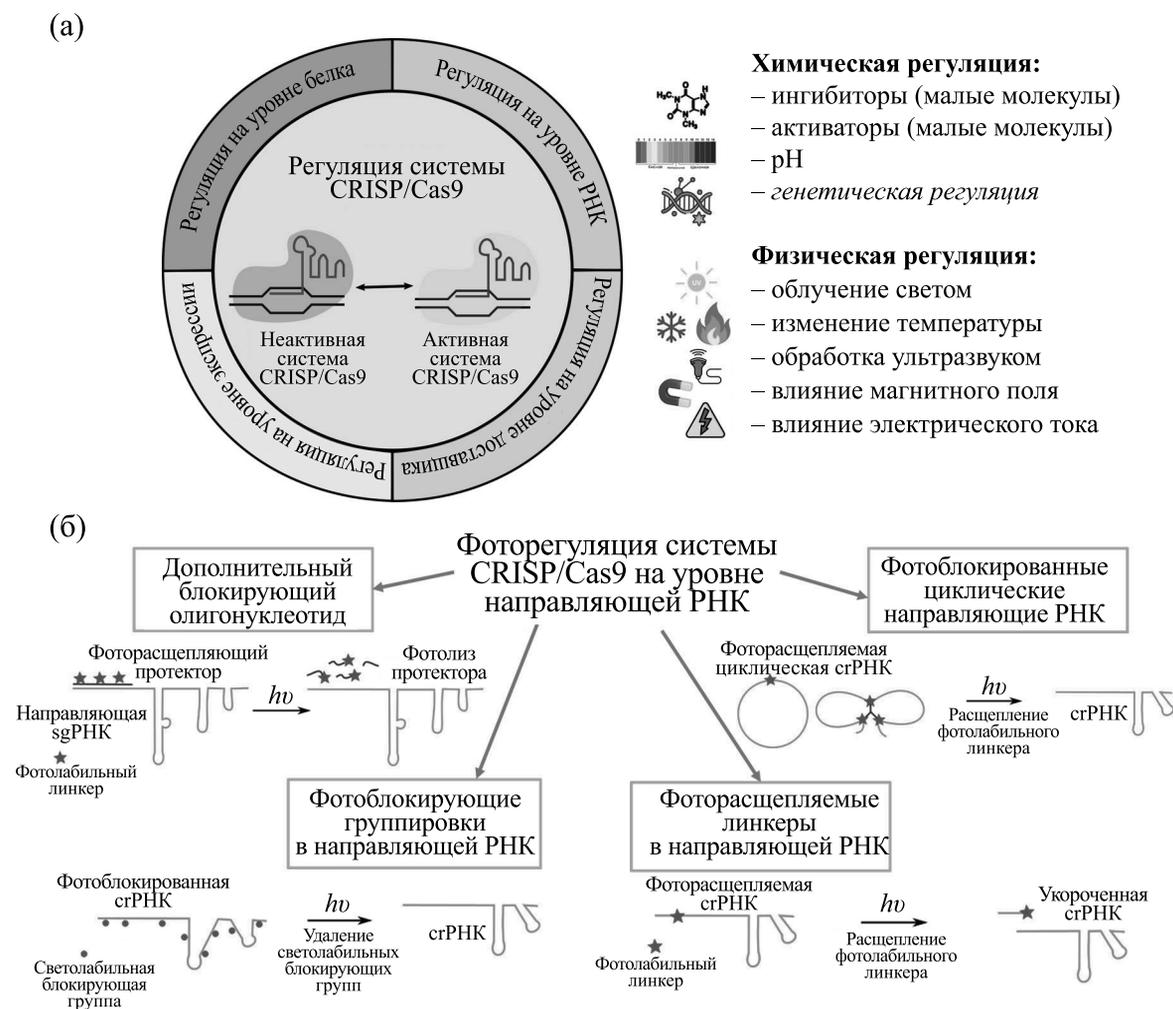


Рис. 1. (а) – Подходы к регуляции систем CRISPR/Cas9. (б) – Варианты фоторегуляции системы CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК.

комплекс и вносят двуцепочечные разрывы в определенные последовательности ДНК. В другом варианте используется пара направляющих РНК, CRISPR-РНК и *транс*-активирующая РНК (сгРНК/tracrРНК), в комплексе с нуклеазой Cas9. Разработка подходов к контролируемому включению и выключению системы CRISPR/Cas9 является одной из актуальных задач синтетической биологии, молекулярной биологии, биоорганической химии и генетической инженерии [12].

В настоящее время созданы платформы CRISPR, регулируемые физическими стимулами: облучением, магнитным полем, температурным или ультразвуковым воздействием [13, 14]. Воздействие физическими факторами на такие системы позволяет контролировать активность, структуру, функции, транспорт, экспрессию и выведение компонентов CRISPR/Cas9-систем из организма (рис. 1а).

Фотоконтролируемые элементы могут быть введены в состав белковой компоненты системы, в направляющую РНК или доставляющий агент. Необходимо отметить, что большинство работ по созданию фоторегулируемых систем геномного редактирования в настоящее время выполнено на системе CRISPR/Cas9 и существует лишь несколько работ по созданию других типов фоторегулируемых систем геномного редактирования [15].

В литературе описаны подходы с использованием фотоактивируемой CRISPR-системы, в которой белок Cas9 конъюгирован с другими фоточувствительными биомолекулами [7, 16, 17] или содержит фотомодифицированный аминокислотный остаток [18, 19]. Активно разрабатываются и используются фотоактивируемые системы геномного редактирования, регулируемые на уровне доставщиков [20–22].

Достаточно большое количество работ посвящено созданию фоторегулируемых систем CRISPR/Cas9, в которых используются подходы к регуляции на уровне направляющих РНК. Данный обзор посвящен именно таким регулируемым системам геномного редактирования.

ПОДХОДЫ К ФОТОРЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ CRISPR/Cas9 НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

В настоящее время в области создания фоторегулируемых направляющих РНК для систем CRISPR можно выделить четыре основных направления: 1) использование дополнительных блокирующих олигонуклеотидов, облучение которых приводит к их разрушению и активации направляющей РНК; 2) введение фотоблокирующих группировок в состав направляющих РНК для активации РНК путем облучения; 3) введение фоторасщепляемых линкеров в состав направляющих РНК, позволяющих разрушить направляющую РНК облучением и дезактивировать систему; 4) создание кольцевых или замкнутых направляющих РНК, которые не активны до облучения, а после облучения линейризуются и способны выполнять свои функции в составе CRISPR-систем (рис. 1б).

Кроме этих четырех вариантов существует еще несколько единичных работ, где используются отличные от представленных на рисунке подходы к фоторегуляции системы CRISPR/Cas9.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ БЛОКИРУЮЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

Исторически первым подходом к фоторегуляции системы CRISPR был подход с использованием дополнительных блокирующих олигонуклеотидов (протекторов), которые связываются со спейсером направляющей РНК и блокируют его взаимодействие с ДНК-мишенью. Такой подход более прост в реализации в сравнении с химическим синтезом достаточно протяженных фотомодифицированных направляющих РНК длиной от 42 нуклеотидов (в случае сгРНК) и до 102–120 нуклеотидов (в случае sgРНК). В состав блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов в ходе химического синтеза вводили фоторасщепляемые линкеры, способные при облучении ультрафиолетовым светом разрушать фосфодиэфирную связь и приводить к гидролизу олигонуклеотида в заданном положении. Впервые такой подход был предложен и апробирован в работе [6]. Авторы работы использовали комплементарные сгРНК олигодезоксирибонуклеотиды, которые содержали в себе один или несколько фоторасщепляемых

линкеров на основе (1-(2-нитрофенил)-пропан-диола) (рис. 2а).

Блокирующие олигонуклеотиды связываются с сгРНК, образуя комплементарный дуплекс, не позволяющий сгРНК сформировать комплекс с ДНК-мишенью и инициировать работу CRISPR/Cas9 системы. При воздействии двухпятисекундного облучения ($\lambda = 365$ нм) блокирующий олигодезоксирибонуклеотид гидролизуетсся с образованием коротких олигомеров, обладающих меньшим сродством к сгРНК. Авторы назвали свой подход CRISPR-плюс (рис. 2в). После облучения направляющая РНК к ДНК гена EGFP высвобождается, связывается с мишенью и запускает работу CRISPR-системы, в результате происходит подавление синтеза EGFP и уменьшение флуоресценции белка в клетках.

Аналогичный подход был впоследствии использован и в работе российских авторов, также использовавших фоторасщепляемые блокирующие РНК для фотоактивации системы CRISPR/Cas9 [23]. В этой работе авторы использовали аналогичный фоторасщепляемый линкер, но уже на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (рис. 2б). В модельной системе продемонстрирована возможность фотоактивации систем CRISPR/Cas9, содержащих как сгРНК, так и пару направляющих РНК сгРНК/tracrРНК.

Использование фоторасщепляемого блокирующего олигонуклеотида, содержащего остаток пирена на 3'-конце, позволило авторам работы [24] иммобилизовать направляющую РНК на поверхности углеродных наночастиц (углеродные нанотрубки, парамагнитные железные наночастицы в углеродной оболочке) (рис. 2г).

До облучения направляющая сгРНК иммобилизована на поверхности углеродных наночастиц, в результате облучения происходит гидролиз блокирующего олигодезоксирибонуклеотида и высвобождение направляющей РНК. Авторы работы продемонстрировали возможность высвобождения направляющей РНК с поверхности углеродных наночастиц под действием ультрафиолетового (УФ) облучения, в результате которого происходила активация системы CRISPR/Cas9 и гидролиз ДНК-мишени.

Использование одностенных углеродных нанотрубок и парамагнитных железных наночастиц в углеродной оболочке может оказаться перспективным подходом к доставке компонентов системы геномного редактирования в клетки.

В работе [25] описано использование дополнительного фоторасщепляемого олигонуклеотида для введения компонентов CRISPR/Cas9 в систему доставки на основе ДНК-нанокольца. Для закрепления комплексов сгРНК/Cas9 в структуре ДНК-нанокольца в последовательность сгРНК добавляли олигонуклеотидный фрагмент, ком-

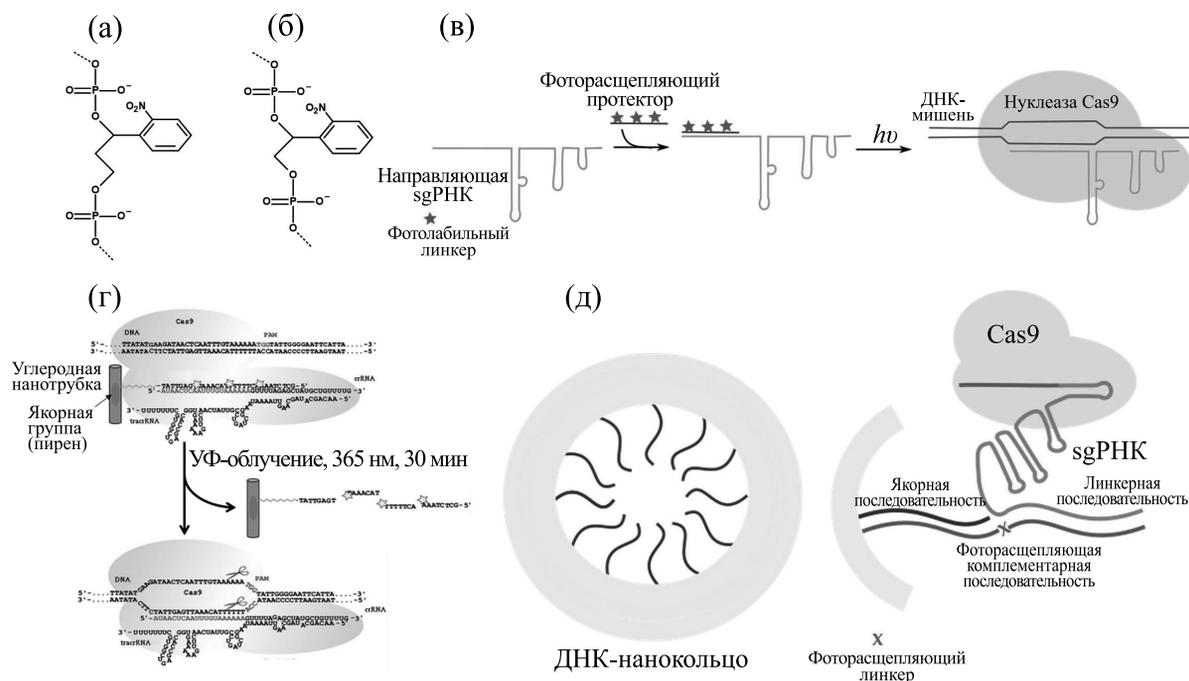


Рис. 2. (а) – Структура фоторасщепляемого линкера на основе 1-(2-нитрофенил)-пропандиола. (б) – Структура фоторасщепляемого линкера на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. (в) – Концепция CRISPR-плюс. (г) – Фоторегулируемое высвобождение направляющей sgРНК с поверхности углеродных нанотрубок и активация системы CRISPR/Cas9. (д) – Система CRISPR/Cas9, заключенная внутрь ДНК-нанокольца. Структура фоторасщепляемого линкера X представлена на панели (а).

плементарный дополнительно фоторасщепляемому олигодезоксирибонуклеотиду (рис. 2д).

Этот дополнительный олигонуклеотид содержит фрагмент, комплементарный sgРНК и ДНК-«якорю» (якорная последовательность) в составе ДНК-нанокольца. В состав нанокольца вводили 12 ДНК-«якорей». При облучении дополнительный олигонуклеотид, связывающий sgРНК и ДНК-«якорь» в составе нанокольца, разрушался и комплекс sgРНК/Cas9 высвобождался.

Другим вариантом регуляции системы CRISPR/Cas9 является использование дополнительного фотоблокированного олигонуклеотида, который может взаимодействовать с sgРНК только после облучения и удаления блокирующих группировок (рис. 3). В качестве фотоблокирующих групп в составе олигонуклеотида использовали 6-нитропиперонилоксиметильные группировки, введенные по остаткам тимидина (рис. 3в).

Этот подход был предложен в работе [26] в двух вариантах: для активации и для инактивации системы CRISPR/Cas9. В случае активации в состав sgРНК на 3'-конец добавляли олигонуклеотидный фрагмент, комплементарно взаимодействующий со спейсером и дополнительным олигонуклеотидом (рис. 3а). Для возможности инак-

тации системы на 5'-конец sgРНК добавляли олигонуклеотидный участок для взаимодействия с дополнительным олигонуклеотидом (рис. 3б). Дополнительные олигонуклеотиды конструировали таким образом, чтобы они могли разрушать в первом случае внутримолекулярный комплекс sgРНК, а во втором случае – дуплекс между спейсером sgРНК и протоспейсером в ДНК-мишени.

Подход к фоторегуляции с использованием фоторасщепляемых блокирующих олигонуклеотидов был адаптирован к системе CRISPR/Cas12a, которая отличается более короткой направляющей РНК и нуклеазой [15, 27]. Интересной особенностью РНК-направляемой ДНКазы Cas12a является ее способность после узнавания и гидролиза целевой ДНК-мишени (*цис*-расщепление) гидролизовать любые одноцепочечные ДНК независимо от их последовательности (*транс*-расщепление) [28, 29]. Дженнифер Даудной с коллегами был предложен подход к детекции вируса папилломы в клинических образцах с использованием Cas12a нуклеазы, действие которой основано на этой необычной способности нуклеазы. Такой подход был назван DETECTR (DNA Endonuclease-Target CRISPR Trans Reporter) [30].

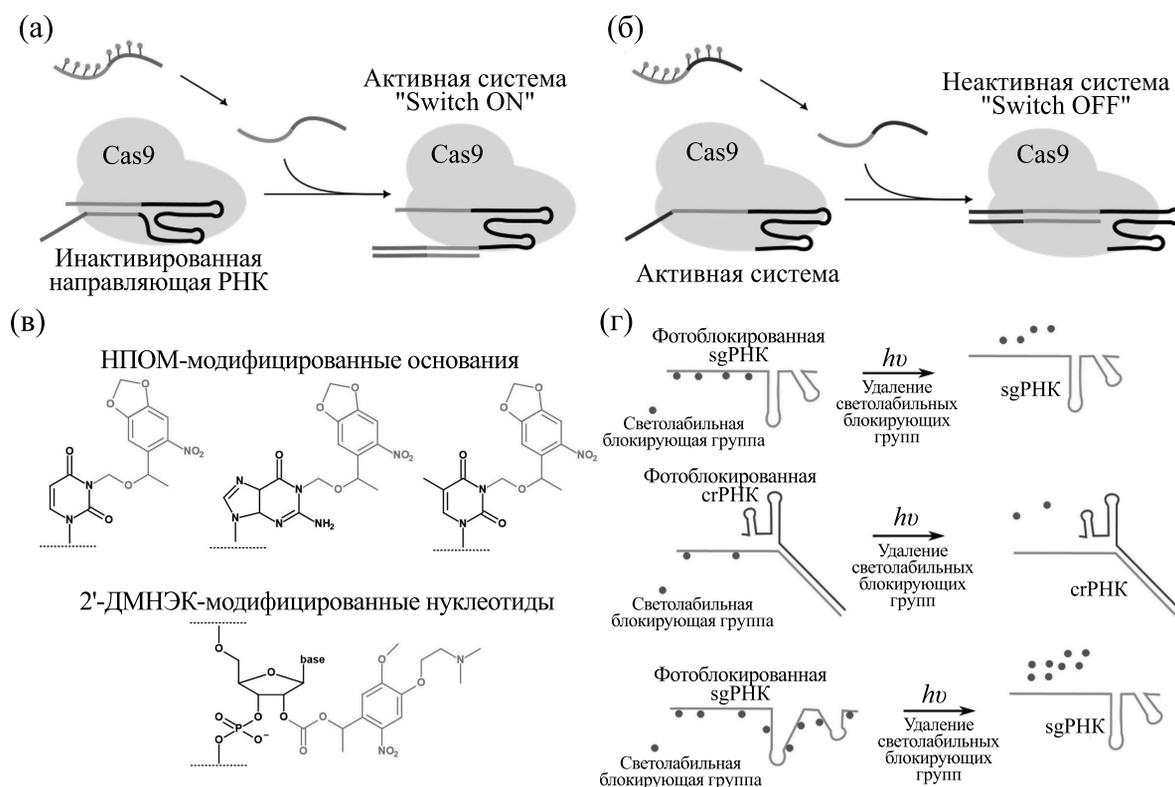


Рис. 3. Подходы к включению/выключению направляющей РНК с использованием фотоактивируемого замещения цепи для функционального контроля системы CRISPR/Cas9: (а) – активация системы, (б) – инактивация системы. (в) – Структуры фотоблокированных азотистых оснований урацила, тимина и гуанина с фотоотщепляющимися 6-нитропиперонилоксиметильными (НПОМ) группировками и нуклеотида, содержащего в 2'-положении 1-(4-(2-диметиламино)этокси)5-метокси-2-нитрофенил)этилкарбонильную (ДМНЭК) группу. (г) – Схематическое изображение вариантов активации направляющих РНК в результате облучения.

В работах [15, 27] описана разработка и использование такой системы детекции с возможностью оптической активации. Такой подход позволяет увеличить специфичность работы системы DETECTR.

ФОТОБЛОКИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

В других вариантах фоторегуляции работы системы CRISPR/Cas9 используют модифицированные sgРНК или crРНК, содержащие фотоблокирующие группировки в различных положениях олигорибонуклеотидной цепи. В литературе представлены варианты sgРНК и crРНК, содержащие фотоотщепляемые блокирующие группировки в гетероциклических основаниях, по 2'-положению рибозы или по межнуклеотидным фосфатным группам [12]. Такие фотоблокированные направляющие РНК не активны вплоть до облучения УФ-светом и удаления фотоблокирующих групп.

Например, в работе [31] авторы вводили фотоотщепляемые 6-нитропиперонилоксиметильные

группировки в N3-положение уридина и в N1-положение гуанозина в области спейсера (рис. 3в). Олигорибонуклеотиды получали твердофазным фосфитамидным методом синтеза. После действия УФ-излучения происходило отщепление блокирующих группировок и восстановление активности комплекса Cas9:sgРНК, что приводило к гидролизу ДНК-мишени в клетках зародышей рыб *Danio rerio*. Активность системы геномного редактирования регистрировали с использованием репортерной системы с участием гена флуоресцентного белка EGFP. При активации системы CRISPR/Cas9 наблюдали уменьшение флуоресценции белка в клетках.

Аналогичные результаты были получены в работе [32], где авторы также использовали фотоблокирующие группировки, введенные по гетероциклическому основанию в ходе твердофазного фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов в составе модифицированных фосфитамидов (рис. 3г). Работу проводили на нескольких линиях клеток и на эмбрионах рыбок *Danio rerio*.

В работе [33] авторы модифицировали направляющую sgРНК по 2'-положению рибозы не

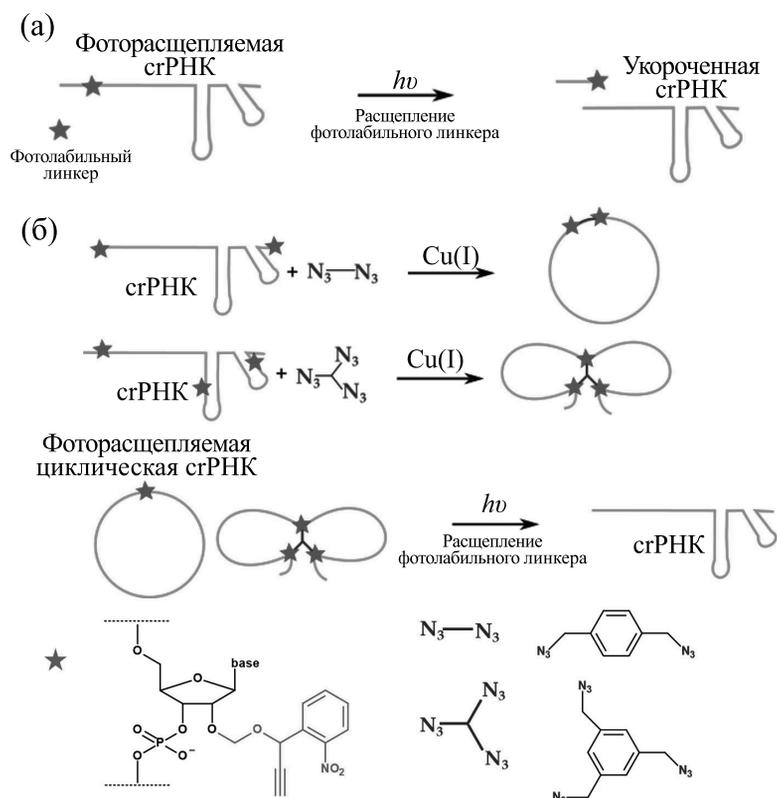


Рис. 4. (а) – Система CRISPR/Cas9, содержащая фоторасщепляемый линкер и способная «выключаться» под действием света. (б) – Схематическое изображение моно- и бициклических направляющих РНК и структура модификаций, использованных для их получения.

только в участке, отвечающем за связывание с ДНК-мишенью, но и в остальной части молекулы (рис. 3г). Модификацию проводили пост-синтетически, обрабатывая sgРНК активированным производным 1-(4-(2-диметиламино)этоксид)5-метокси-2-нитрофенил)этанола. Модификация проходила статистически по всем доступным 2'-гидроксильным группам. Продемонстрирована возможность использования предложенной стратегии в системах с нуклеазой Cas9 и Cas13a.

ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

Введение фоторасщепляемых линкеров непосредственно в состав направляющей РНК позволяет разрушить эту направляющую РНК путем облучения в необходимый момент времени и тем самым прекратить работу системы геномного редактирования. Так, в работах [34, 35] авторы вводили фоторасщепляемый линкер в состав направляющей crРНК в область спейсера, что позволило им эффективно отключать систему в определенный момент времени (рис. 4а).

Введение двух фоторасщепляемых линкеров в состав направляющей crРНК позволяет более эффективно «выключать» систему редактирования генома путем УФ-облучения [36]. Возможности такой регуляции продемонстрированы на модельных плазидах, содержащих ген EGFP.

В работе [37] авторы работы в ходе твердофазного фосфитамидного синтеза вводили два фоторасщепляемых линкера в область взаимодействия sgРНК с нуклеазой Cas9 (положения 57 и 74). При облучении такой фоторасщепляемой sgРНК наблюдали образование трех фрагментов РНК. Возможность инактивации системы CRISPR/Cas9, содержащей эту фоторасщепляемую sgРНК, была продемонстрирована в клетках HEK293 и U2OS.

ФОТОБЛОКИРОВАННЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

Интересным подходом к созданию фотоактивируемых направляющих РНК является получение циклических фоторасщепляемых направляющих РНК, которые при действии света способны линеаризоваться и образовывать комплекс с нуклеазой Cas9 и ДНК-мишенью. Подход к син-

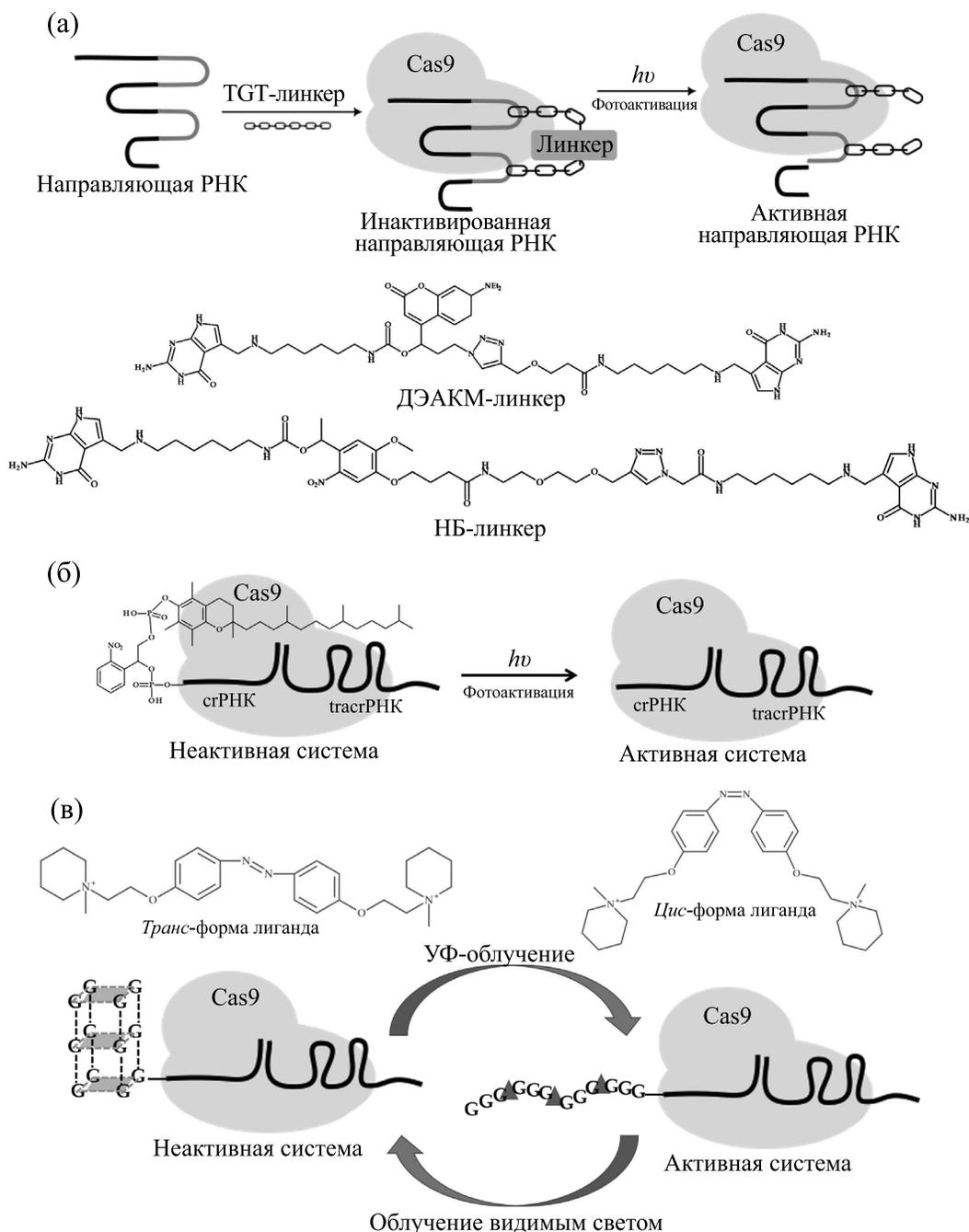


Рис. 5. (а) – Принцип получения и использования фоторасщепляемых циклических направляющих РНК с использованием тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT) и специально сконструированных фоточувствительных линкеров, содержащих [7-(диэтиламино)кумарин-4-ил]-метилловый (ДЭАКМ) линкер (фоторасщепляется при облучении светом с длиной волны 405–456 нм) или линкер на основе нитробензола (НБ) (фоторасщепляется при облучении светом с длиной волны 356–390 нм). (б) – Фотоактивация системы CRISPR/Cas9, содержащей 5'-модифицированную токоферолом crРНК. (в) – Регуляция направляющей РНК, содержащей последовательность, способную формировать квадруплекс, в присутствии лиганда и при облучении светом определенной длины волны.

тезу таких направляющих РНК предложен в работах [38–40] (рис. 4б). Для синтеза использовали модифицированные алкильными группами РНК и би- или трифункциональный азид, позволяющий проводить циклизацию таких РНК.

Для циклизации направляющих РНК может быть использован и ферментативный подход с использованием бактериальной тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT), описанный в работе [41] (рис. 5а). Авторы работы разработали лин-

керы, обеспечивающие сайт-специфическое ферментативное связывание двух выбранных остатков гуанина в последовательности направляющей РНК. Наиболее удачным оказался вариант, когда два сшиваемых гуанина были расположены в петлях шпильчатых структур sgРНК. Такая внутримолекулярная циклизация нарушает функциональную активность РНК, а возможность фоторасщепления введенного линкера позволяет восстановить функции РНК путем облучения. В состав линкеров вводили производные кумарина или нитробензола, которые вызывают фоторасщепление линкера при облучении в различном диапазоне длин волн: 405–456 или 356–390 нм соответственно. Таким образом, эти варианты фотоактивируемых систем CRISPR/Cas9 можно использовать для мультиплексной активации систем геномного редактирования в клетках.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ СИСТЕМ CRISPR/Cas9

Интересным вариантом фотоблокированной направляющей РНК является РНК, содержащая на 5'-конце объемную гидрофобную молекулу, введенную через фоторасщепляемый линкер. Наличие определенных объемных молекул, например, токоферола, на 5'-конце направляющей РНК блокирует их активность [42]. Облучение такой РНК УФ-светом позволяет разрушить фоторасщепляемый линкер и высвободить направляющую РНК. Ранее такой подход был использован для создания фотоблокированных малых интерферирующих РНК [43–45], а затем был удачно применен и к системе CRISPR/Cas9. Авторы работы [43] предложили crРНК, к 5'-концу которой через фотолabile линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола была присоединена молекула токоферола для временного блокирования тройного рибонуклеопротеидного комплекса Cas9:crРНК:tracrРНК и улучшения проникновения направляющей РНК в определенные типы клеток (рис. 5б). Молекулу токоферола вместе с фотолabile линкером удаляли путем УФ-облучения. Эффективность данного подхода продемонстрирована как *in vitro* с использованием модельных ДНК-дуплексов, так и *in vivo* для воздействия на ДНК гена фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGFA-A – Vascular Endothelial Growth Factor A) в клетках HEK293T.

В работе [46] на 5'-конец направляющей РНК вводили дополнительную последовательность, способную формировать квадруплекс.

Присутствие квадруплекса ингибировало действие нуклеазы Cas9. Использование лиганда, об-

ратимо изменяющего свою структуру под действием облучения ультрафиолетовым или видимым светом, позволило влиять на стабильность квадруплекса и, соответственно, на активность системы (рис. 5в). Интересно, что добавление G-квадруплекса на 3'-конец sgRNA не влияло на эффективность редактирования мишени и повышало время жизни направляющей РНК в 5 раз [47, 48].

Таким образом, создание CRISPR/Cas9-систем с улучшенными характеристиками, а именно с длительным временем жизни в клетках и организмах, высокой эффективностью и специфичностью действия, а также с возможностью регуляции активности – является актуальным направлением в области геномного редактирования. Многообещающим подходом для решения этой задачи является использование модифицированных направляющих РНК в составе CRISPR/Cas9 систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность чл.-корр. РАН, д.б.н. Д.О. Жаркову (ИХБФМ СО РАН) за инициацию работ по созданию и использованию фоторасщепляемых направляющих РНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор написан при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00294), а также за счет базового бюджетного финансирования в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021–2024 гг., проект № 121031300042-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang X. and Dmochowski I. J. Controlling RNA digestion by RNase H with a light-activated DNA hairpin. *Angew. Chemie. Int. Ed.*, **45** (21), 3523–3526 (2006). DOI: 10.1002/anie.200600954
2. Matsushita-Ishiodori Y. and Ohtsuki T. Photoinduced RNA interference. *Acc. Chem. Res.*, **45** (7), 1039–1047 (2012). DOI: 10.1021/ar200227n
3. Ахметова Е. А., Ким Д. В., Доме А. С., Мещанинова М. И. и Новопашина Д. С. Новый подход к синтезу фотоблокированных малых интерферирующих РНК для активируемой светом РНК-интерференции. *Биоорг. химия*, **48** (5), 580–588 (2022). DOI: 10.31857/S0132342322050037
4. Shen Y., Li Z., Wang G., and Ma N. Photocaged nanoparticle sensor for sensitive microRNA imaging in living cancer cells with temporal control. *ACS Sensors*,

- 3 (2), 494–503 (2018). DOI: 10.1021/acssensors.7b00922
5. Griepenburg J. C., Ruble B. K., and Dmochowski I. J. Caged oligonucleotides for bidirectional photomodulation of let-7 miRNA in zebrafish embryos. *Bioorg. Med. Chem.*, **21** (20), 6198–6204 (2013). DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.082
6. Jain P. K., Ramanan V., Schepers A. G., Dalvie N. S., Panda A., Fleming H. E., and Bhatia S. N. Development of light-activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55** (40), 12440–12444 (2016). DOI: 10.1002/anie.201606123
7. Nuñez J. K., Harrington L. B., and Doudna J. A. Chemical and biophysical modulation of Cas9 for tunable genome engineering. *ACS Chem. Biol.*, **11** (3), 681–688 (2016). DOI: 10.1021/acscchembio.5b01019
8. O'Hagan M. P., Duan Z., Huang F., Laps S., Dong J., Xia F., and Willner I. Photocleavable ortho-nitrobenzyl-protected DNA architectures and their applications. *Chem. Rev.*, **123** (10), 6839–6887 (2023). DOI: 10.1021/acs.chemrev.3c00016
9. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337** (6096), 816–812 (2012). DOI: 10.1126/science.1225829
10. Wang J. Y., Pausch P., and Doudna J. A. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nat. Rev. Microbiol.*, **20** (11), 641–656 (2022). DOI: 10.1038/s41579-022-00739-4
11. Makarova K. S., Wolf Y. I., Iranzo J., Shmakov S. A., Alkhnbashi O. S., Brouns S. J. J., Charpentier E., Cheng D., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Scott D., Shah S. A., Siksnys V., Terns M. P., Venclovas C., White M. F., Yakunin A. F., Yan W., Zhang F., Garrett R. A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., and Koonin E. V. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18** (2), 67–83 (2020). DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
12. Brown W., Zhou W., and Deiters A. Regulating CRISPR/Cas9 function through conditional guide RNA control. *ChemBioChem*, **22** (1), 63–72 (2021). DOI: 10.1002/cbic.202000423
13. Galizi R. and Jaramillo A. Engineering CRISPR guide RNA riboswitches for in vivo applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **55**, 103–113 (2019). DOI: 10.1016/j.copbio.2018.08.007
14. Zhuo C., Zhang J., Lee J.-H., Jiao J., Cheng D., Liu L., Kim H.-W., Tao Y., and Li M. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 gene editing. *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6** (1), 238 (2021). DOI: 10.1038/s41392-021-00645-w
15. Chen Y., Xu X., Wang J., Zhang Y., Zeng W., Liu Y., and Zhang X. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis. *Anal. Chem.*, **94** (27), 9724–9731 (2022). DOI: 10.1021/acs.analchem.2c01193
16. Nihongaki Y., Yamamoto S., Kawano F., Suzuki H., and Sato M. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem. Biol.*, **22** (2), 169–174 (2015). DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.12.011
17. Manna D., Maji B., Gangopadhyay S. A., Cox K. J., Zhou Q., Law B. K., Mazitschek R., and Choudhary A. A singular system with precise dosing and spatiotemporal control of CRISPR-Cas9. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58** (19), 6285–6289 (2019). DOI: 10.1002/anie.201900788
18. Hemphill J., Borchardt E. K., Brown K., Asokan A., and Deiters A. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing. *J. Am. Chem. Soc.*, **137** (17), 5642–5645 (2015). DOI: 10.1021/ja512664v
19. Zhou W. and Deiters A. Conditional control of CRISPR/Cas9 function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55** (18), 5394–5399 (2016). DOI: 10.1002/anie.201511441
20. Lyu Y., He S., Li J., Jiang Y., Sun H., Miao Y., and Pu K. A photolabile semiconducting polymer nanotransducer for near-infrared regulation of CRISPR/Cas9 gene editing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58** (50), 18197–18201 (2019). DOI: 10.1002/anie.201909264
21. Chen X., Chen Y., Xin H., Wan T., and Ping Y. Near-infrared optogenetic engineering of photothermal nanoCRISPR for programmable genome editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117** (5), 2395–2405 (2020). DOI: 10.1073/pnas.1912220117
22. Peng H., Le C., Wu J., Li X.-F., Zhang H., and Le X. C. A genome-editing nanomachine constructed with a clustered regularly interspaced short palindromic repeats system and activated by near-infrared illumination. *ACS Nano*, **14** (3), 2817–2826 (2020). DOI: 10.1021/acsnano.9b05276
23. Ахметова Е. А., Гольшев В. М., Вохтанцев И. П., Мещанинова М. И., Веньяминова А. Г. и Новопашина Д. С. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9. *Биоорг. химия*, **47** (2), 276–286 (2021). DOI: 10.31857/S0132342321020020
24. Semikolenova O. A., Sakovina L., Akhmetova E., Kim D., Vokhtantsev I., Golyshov V., Vorobyeva M., Novopashin S., and Novopashina D. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 system based on crRNA reversibly immobilized on carbon nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10919 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010919
25. Abe K., Sugiyama H., and Endo M. Construction of an optically controllable CRISPR–Cas9 system using a DNA origami nanostructure. *Chem. Commun.*, **57** (45), 5594–5596 (2021). DOI: 10.1039/d1cc00876e
26. Wang Y., Wu C. Q., Zhang Q. L., Shao M., Liu Y., Wang L.-L., Wang Z.-Y., Du J., and Xu L. Switching on/off of guide RNA by photoinduced strand displacement for functional control of CRISPR/Cas9. *CCS Chemistry*, **6** (5), 1338–1351 (2024). DOI: 10.31635/ccschem.023.202303379
27. Hu M., Qiu Z., Bi Z., Tian T., Jiang Y., and Zhou X. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **119** (26), e2202034119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2202034119
28. Aman R., Mahas A., and Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth. Biol.*, **9** (6), 1226–1233 (2020). DOI: 10.1021/acssynbio.9b00507
29. Wang Y., Yang T., Liu G., Xie L., Guo J., and Xiong W. Application of CRISPR/Cas12a in the rapid detection of pathogens. *Clin. Chim. Acta*, **548**, 117520 (2023). DOI: 10.1016/j.cca.2023.117520
30. Chen J. S., Ma E. B., Harrington L. B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J. M., and Doudna J. A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, **360** (6387), 436–439 (2018). DOI: 10.1126/science.aar6245
31. Zhou W., Brown W., Bardhan A., Delaney M., Ilk A. S., Rauen R. R., Kahn S. I., Tsang M., and Deiters A. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 function in cells and zebrafish using light-activated guide RNA. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **59** (23), 8998–9003 (2020). DOI: 10.1002/anie.201914575
32. Moroz-Omori E. V., Satyapertiwi D., Ramel M.-C., Høgset H., Sunyovszki I. K., Liu Z., Wojciechowski J. P., Zhang Y., Grigsby C. L., Brito L., Bugeon L., Dallman M. J., and Stevens M. M. Photoswitchable gRNAs for spatiotemporally controlled CRISPR-Cas-based genomic regulation. *ACS Cent. Sci.*, **6** (5), 695–703 (2020). DOI: 10.1021/acscentsci.9b01093
33. Wang S., Wei L., Wang J.-Q., Ji H., Xiong W., Liu J., Yin P., Tian T., and Zhou X. Light-driven activation of RNA-guided nucleic acid cleavage. *ACS Chem. Biol.*, **15** (6), 1455–1463 (2020). DOI: 10.1021/acscchembio.0c00105
34. Zou R.S., Liu Y., Wu B., and Ha T. Cas9 deactivation with photocleavable guide RNAs. *Mol. Cell.*, **81** (7), 1553–1565 (2021). DOI: 10.1016/j.molcel.2021.02.007
35. Zou R.S., Liu Y., and Ha T. CRISPR deactivation in mammalian cells using photocleavable guide RNAs. *STAR Protoc.*, **2** (4), 100909 (2021). DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100909
36. Новопашина Д. С., Ахметова Е. А., Мещанинова М. И., Вохтанцев И. П., Жарков Д. О. и Веньяминова А. Г. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9 и способ ее получения. Патент РФ 2765159 от 26.08.2020.
37. Carlson-Stevermer J., Kelso R., Kadina A., Joshi S., Rossi N., Walker J., Stoner R., and Maures T. CRISPRoff enables spatio-temporal control of CRISPR editing. *Nat. Commun.*, **11** (1), 5041 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-18853-3
38. Sun Y.-J., Chen W.-D., Liu J., Li J.-J., Zhang Y., Cai W.-Q., Liu L., Tang X.-J., Hou J., Wang M., and Cheng L. A conformational restriction strategy for the control of CRISPR/Cas gene editing with photoactivatable guide RNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **62** (5), e202212413 (2023). DOI: 10.1002/anie.202212413
39. Müller P., Seyfried P., Frühauf A., and Heckel A. Phosphodiester photo-tethers for the (multi-)cyclic conformational caging of oligonucleotides. *Methods Enzymol.*, **624**, 89–111 (2019). DOI: 10.1016/bs.mie.2019.04.019
40. Seyfried P., Eiden L., Grebenovsky N., Mayer G., and Heckel A. Photo-tethers for the (multi-)cyclic, conformational caging of long oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56** (1), 359–363 (2017). DOI: 10.1002/anie.201610025
41. Zhang D., Liu L., Jin S., Tota E., Li Z., Piao X., Zhang X., Fu X.-D., and Devaraj N. K. Site-specific and enzymatic cross-linking of sgRNA enables wavelength-selectable photoactivated control of CRISPR gene editing. *J. Am. Chem. Soc.*, **144** (10), 4487–4495 (2022). DOI: 10.1021/jacs.1c12166
42. Zhang Y., Ling X., Su X., Zhang S., Wang J., Zhang P., Feng W., Zhu Y. Y., Liu T. and Tang X. Optical control of a CRISPR/Cas9 system for gene editing by using photolabile crRNA. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **59** (47), 20895–20899 (2020). DOI: 10.1002/anie.202009890
43. Yang J., Chen C., and Tang X. Cholesterol-modified caged siRNAs for photoregulating exogenous and endogenous gene expression. *Bioconjug. Chem.*, **29** (4), 1010–1015 (2018). DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.8b00080
44. Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., and Tang X. Photochemical regulation of gene expression using caged siRNAs with single terminal vitamin E modification. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55** (6), 2152–2156 (2016). DOI: 10.1002/anie.201510921
45. Yu L., Jing N., Yang Z., Zhang L., and Tang X. Caged siRNAs with single folic acid modification of antisense RNA for photomodulation of exogenous and endogenous gene expression in cells. *Org. Biomol. Chem.*, **16** (38), 7029–7035 (2018). DOI: 10.1039/c8ob01952e
46. Deng H., Xu H., Wang Y., Jia R., Ma X., Feng Y., and Chen H. G-quadruplex-based CRISPR photoswitch for spatiotemporal control of genomic modulation. *Nucl. Acids Res.*, **51** (8), 4064–4077 (2023). DOI: 10.1093/nar/gkad178.
47. Filippova J., Matveeva A., Zhuravlev E., and Stepanov G. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. *Biochimie*, **167**, 49–60 (2019). DOI: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
48. Nahar S., Sehgal P., Azhar M., Rai M., Singh A., Sivasubbu S., Chakraborty D., and Maiti S. A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR-Cas9 based genome editing efficiency. *Chem. Commun.*, **54** (19), 2377–2380 (2018). DOI: 10.1039/c7cc08893k

CRISPR/Cas System Photocontrolled at the Guide RNA Level**L.V. Sakovina^{*, **}, E.S. Gorlenko^{*, **}, and D.S. Novopashina^{*, **}**

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

Improving the efficiency and precision of gene editing systems is of utmost importance for modern molecular biology and genetic engineering. Of particular interest is the design of controlled CRISPR/Cas9 systems, the activity of which could be regulated using different physico-chemical stimuli such as light irradiation, pH change, temperature, change of molecule concentration and so forth. A promising direction in this area is the development of approaches to control activity at the level of guide RNA through photosensitive modifications to the structure and sequence of guide RNA, and additional oligonucleotides. This review is devoted to the analysis of publications on design of photosensitive guide RNAs and their applications in genome editing systems using CRISPR.

Keywords: regulated CRISPR/Cas9 system, UV-irradiation, guide RNA, photocleavable linker, photocaged oligonucleotides

ВЛИЯНИЕ ГЕНИСТЕИНА НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ И ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ С PARP1

© 2024 г. Т.В. Андреева*, А.В. Ефременко**, А.В. Феофанов*, **, А.В. Любителев*,
А.Н. Коровина*, В.М. Студитский*, ***, Н.В. Малоченко*.*#

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

***Онкологический центр Фокса Чейза, Филадельфия, США

#E-mail: mal_nat@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

Полифенол растительного происхождения – генистеин – обладает высокой биологической активностью, что стимулирует изучение его применимости для профилактики и лечения опухолевых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. С учетом способности генистеина связываться с ДНК в настоящей работе исследовано взаимодействие генистеина с нуклеосомами и комплексами нуклеосом с поли-(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1). Установлено, что в широком диапазоне концентраций генистеин не влияет на структуру нуклеосомной ДНК, но при высокой концентрации вызывает изменение структуры линкерной ДНК, сближая спирали ДНК между собой. В хроматосомах генистеин не вызывает диссоциации линкерного гистона и изменений конформации в области линкерной ДНК. При высокой концентрации генистеин затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1.

Ключевые слова: генистеин, хроматин, клетки A549, нуклеосома, PARP1, H1.0, H1.5, spFRET.

DOI: 10.31857/S0006302924030024, EDN: OGHMOC

Генистеин (рис. 1а) является вторичным метаболитом растений из группы изофлавонов [1]. Генистеин содержится во многих употребляемых в пищу продуктах растительного происхождения, наиболее им богаты соевые культуры [2]. Исследования показали, что генистеин проявляет высокую биологическую активность (рис. 1б), оказывая противовоспалительное [3–5], антиоксидантное [6–8], антиангиогенное и антипролиферативное [9–11] действие. Подобная активность генистеина благоприятна для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма и развитием хронических воспалительных процессов. Продемонстрирована потенциальная эффективность генистеина в качестве противоопухолевого агента на клетках рака легких [12], молочной железы [13], предстательной железы [14], печени [15], репродуктивных женских органов [11], почек [16], мо-

чевого пузыря [17] и ЖКТ [18]. В основе противоопухолевого действия генистеина лежит способность модулировать множественные сигнальные пути в клетке, приводящие к онкотрансформации [17, 19, 20], регулировать клеточный цикл, ингибировать матриксные металлопротеиназы [21], индуцировать апоптоз [12, 22], блокировать и обращать эпителиально-мезенхимальный переход [15, 18], препятствовать про-опухолевым изменениям эпигенетического ландшафта клетки [23]. Исследования показали потенциальное терапевтическое действие генистеина при сердечно-сосудистых заболеваниях [24]. Молекулярная структура генистеина сходна со стероидным гормоном позвоночных эстрадиолом, что определяет гормоноподобную активность генистеина [5].

Для эффективного использования генистеина в медицине необходимо улучшить его биодоступность [25, 26] и доказать безопасность его применения [27]. Одним из важных показателей токсикологической безопасности лекарств является оценка их ДНК-тропного потенциала. Показано, что генистеин способен взаимодействовать с

Сокращения: Hoechst 33342 – флуоресцентный краситель бисбензимида, ДМСО – диметилсульфоксид, EGCG – галлат эпигаллокатехина.

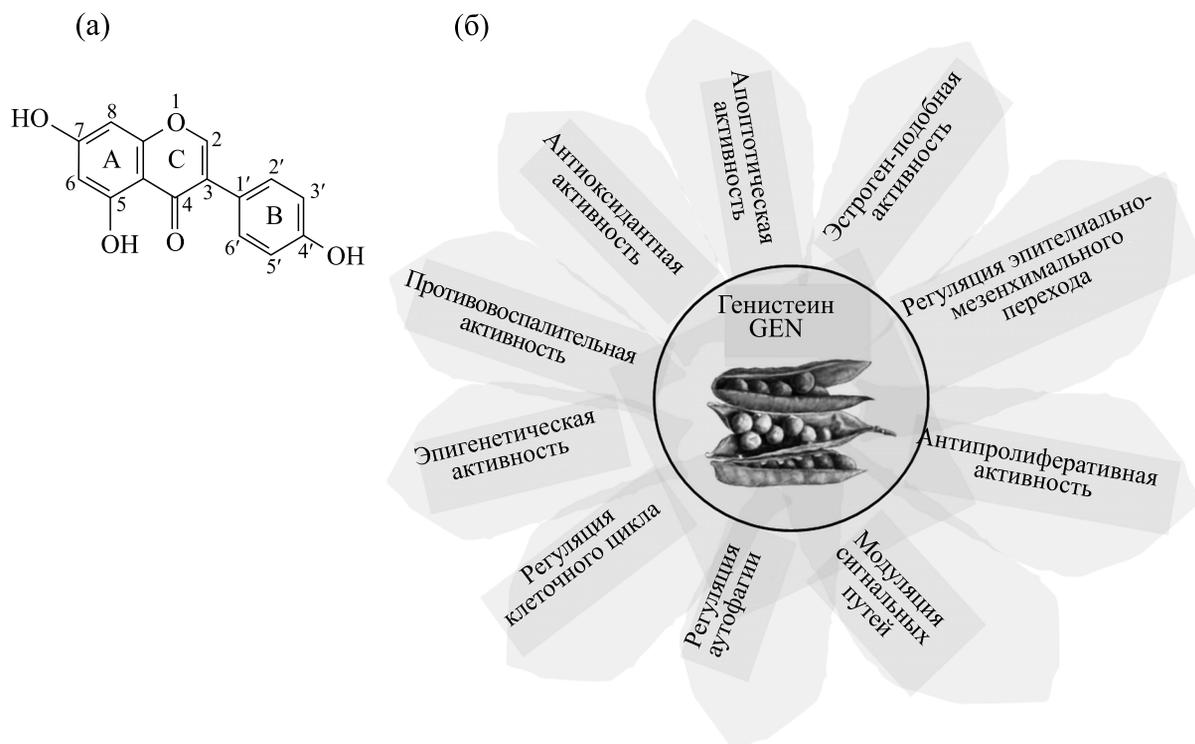


Рис. 1. Структура (а) и виды биологической активности (б) генистеина.

ДНК [28, 29]. Из экспериментов по конкурентному связыванию с ДНК флуоресцирующих интеркаляторов и генистеина следует, что генистеин эффективно взаимодействует с ДНК при концентрациях около 100 мкМ [28], а измеренная константа диссоциации комплекса ДНК-генистеин равна 50 мкМ [29]. Поскольку ДНК упакована в ядре клетки на нуклеосомах и хроматосомах и функционирует в составе хроматина, важно оценить воздействие генистеина на данные морфофункциональные единицы хроматина.

С целью изучения влияния генистеина на структуру хроматина исследована способность генистеина проникать в ядро клеток, а также проведена оценка взаимодействия генистеина с нуклеосомами и хроматосомами, изучено влияние генистеина на взаимодействие и активацию ядерного фермента системы распознавания повреждений и репарации ДНК поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1). Было установлено, что генистеин не влияет на структуру нуклеосом в коровой области, но при этом в высокой концентрации способен сближать линкерные участки ДНК между собой. При высокой концентрации генистеин затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1, но не вызывает диссоциации линкерного гистона H1.0.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки аденокарциномы человека A549 выращивали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone defined (GE Healthcare LifeSciences, США) и 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия). Пересевы клеток проводили 2 раза в неделю. Клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (плотность посева – $2 \cdot 10^4$ клеток/луночка) и выращивали сутки при 37°C и 5% CO₂. Клетки инкубировали с 2 мкМ проникающего в клетки флуоресцентного красителя бисбензимида (Hoechst 33342) в течение 2 ч, добавляли генистеин в диапазоне концентраций 25.0–0.8 мкМ с двойным шагом разведения и инкубировали еще в течение 4 ч. Генистеин из стокового раствора (62.9 мМ в диметилсульфоксиде (ДМСО)) добавляли к клеткам через промежуточное разбавление в ДМСО до 2.5–0.08 мМ. Конечная концентрация ДМСО в лунках с клетками составляла 1%. В качестве контроля использовали клетки, проинкубированные только с 2 мкМ Hoechst 33342 и 1% ДМСО, а также клетки, проинкубированные только с генистеином (25.0–0.8 мкМ), чтобы учесть возможную собственную флуоресценцию полифенола. Изображения клеток в проходящем белом свете и флуоресцентные изображения регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа ZOE Fluorescent Cel-

Imager (Bio-Rad, Singapore). Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали в диапазоне длин волн 335–375 нм, регистрировали в диапазоне 415–451 нм. Флуоресцентные изображения клеток анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institute of Health, США) с использованием плагина “Analyze particles”. Размер выборки 400–600 клеток. Эксперименты выполнены в трех независимых повторах.

Флуоресцентно-меченые ДНК-матрицы длиной 187 п.н. получали методом ПЦР с использованием плазмиды pTZ57R, содержащей нуклеосом-позиционирующую последовательность 603 [30]. Для амплификации использовали синтетические олигонуклеотиды, меченные флуорофорами Cy3 и Cy5 (ООО «Люмипроб РУС», Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров для синтеза матриц ДНК, меченных Cy3 и Cy5 по тиминам в положениях 13 и 91 п.н., 35 и 112 п.н. или 57 и 135 п.н. от начала последовательности 603, были опубликованы ранее [31, 32]. Для получения матрицы ДНК длиной 227 п.н., меченной в линкерных участках ДНК на расстоянии 10 п.н. от начала и конца нуклеосом-позиционирующей последовательности, использовали праймеры, опубликованные в работе [32]. Сборку нуклеосом с использованием октамера гистонов человека проводили методом ступенчатого диализа с понижающейся ионной силой по методике, опубликованной ранее [33]. Рекомбинантные гистоны человека H2A, H2B, H3 и H4, линкерные гистоны H1.0 лягушки и H1.5 человека, а также PARP1 человека получали, как описано ранее [34].

Исследование нуклеосом и их комплексов с генистеином проводили методом микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (микроскопии spFRET) с использованием подхода, описанного в статье [32]. Концентрированный раствор генистеина (Sigma, США) готовили в 25% растворе ДМСО. Нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с генистеином в различных концентрациях (48–400 мкМ, концентрация ДМСО не более 1%) в течение 20 мин в пробирках с низкой адгезией в буфере TB150 (20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанола) при комнатной температуре. Ранее методом spFRET-микроскопии было показано, что ДМСО в концентрации менее 2% не оказывает влияние на структуру нуклеосом [34].

В экспериментах с хроматосомами нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с гистонами H1.0 (15 нМ) или H1.5 (7.6 нМ) в буфере TB150 в течение 15 мин при комнатной температуре, делили раствор на две части и одну из них инкубировали с генистеином (100 мкМ) в течение 20 мин. В экспериментах с PARP1 нуклеосомы (1–2 нМ) инку-

бировали с генистеином в различных концентрациях (100, 200, 400 мкМ) в буфере TB150 при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили PARP1 (20 или 40 нМ) и инкубировали еще 30 мин при комнатной температуре. Для оценки влияния генистеина на каталитическую активность PARP1 пробы готовили следующим образом: нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с полифенолом в различных концентрациях (100, 200, 400 мкМ) в буфере TB150 при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили PARP1 (40 нМ) вместе с β-никотинамидадениндинуклеотидом (NAD⁺, 20 мкМ, Sigma, США) и инкубировали еще 45 мин при комнатной температуре.

Образцы переносили в лунки силиконовой кюветы (Ibidi, Германия), прикрепленной к покровному стеклу (Assistent, Германия), и проводили измерения на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710 с модулем Confoc3 для корреляционной спектроскопии (Zeiss, Германия). Концентрация нуклеосом в растворе (1–2 нМ) была подобрана так, чтобы в фокусе лазера находилось не более одной свободно диффундирующей нуклеосомы. Во время диффузии нуклеосом (<6 мс) через фокус лазера флуоресценцию возбуждали при длине волны 514.5 нм, а регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах длин волн 530–635 нм (флуоресценция Cy3) и 635–800 нм (флуоресценция Cy5). Измеренные интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 использовали для расчета коэффициента близости E , как описано ранее [35]. Коэффициент E – это величина эффективности FRET без коррекции на квантовые выходы флуоресцентных меток и на чувствительность системы детекции в разных диапазонах длин волн. Выборки значений E измеренных частиц (не менее 3000 частиц) представляли в виде частотных распределений, или E -профилей. Измерения выполняли не менее, чем в трех независимых экспериментах, а рассчитанные E -профили усредняли и аппроксимировали линейной суперпозицией нескольких гауссовых распределений, описывающих отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом.

Оценку влияния генистеина на связывание и активность PARP1 проводили методами анализа электрофоретической подвижности нуклеосом и их комплексов в геле при неденатурирующих условиях и с помощью вестерн-блоттинга. Образцы для исследований готовили так же, как и для spFRET-микроскопии. Электрофорез в 5% полиакриламидном геле проводили при 100 В в буфере 0.2×TBE, содержавшем 3.6 мМ Трис (pH 7.5), 3.6 мМ борной кислоты и 0.08 мМ ЭДТА, в течение 1.0–1.2 ч при 4°C. Гель до внесения проб подвергали префорезу. Флуоресцентный анализ гелей проводили с помощью лазерного сканера Typhoon RGB (Amersham, США) при

длине волны возбуждения 532 нм по флуоресценции метки Су3.

Пробы для вестерн-блоттинга нагревали до 95°C в течение 5–10 мин с добавлением буфера для нанесения (5× буфер: 312 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 10% додецилсульфата натрия, 25% β-меркаптоэтанола, 0.05% бромфенолового синего). Пробы наносили на градиентный гель (4–12%, Mini-protean gelsTGX, Bio-Rad, США) и проводили электрофорез в трис-глициновом буфере (25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицина и 0.1% додецилсульфата натрия, рН 8.6) при 130 В в течение 1 ч при комнатной температуре. Перенос белка на подложку из нитроцеллюлозной мембраны (Bio-Rad) осуществляли в буфере для переноса (50 мМ MOPS, 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 3.5 мМ додецилсульфата натрия) с 20% этанолом при 4°C (350 мА, 2 ч). Далее мембрану инкубировали в течение часа в растворе PBS-T (2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 37 мМ NaCl, 0,5% Твин 20), дополненном 5% обезжиренным молоком, и промывали дважды раствором PBS-T по 5 мин. Затем мембрану инкубировали с мышинными моноклональными антителами против полиАДФ-рибозы (10Н, ab14459, Abcam, США) в течение 1 ч в растворе PBS-T, содержащем 5% молока, промывали, инкубировали 1 ч со вторичными анти-мышинными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, Hercules, США), и снова промывали. Иммунодетекцию проводили с использованием системы Chemidoc (Bio-Rad, США) и хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, США) в течение 3 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие генистеина с ДНК изучали *in vitro* [28, 29], однако его способность проникать в клетки и накапливаться в клеточном ядре мало изучена. Ранее нами был предложен новый подход к изучению проникновения ДНК-тропных нефлуоресцирующих и слабо флуоресцирующих соединений в ядра клеток, основанный на исследовании влияния данных соединений на флуоресценцию красителя Hoechst 33342, появляющуюся при образовании им комплексов с ДНК в живых клетках [34]. Инкубация с генистеином клеток A549, ДНК в которых предварительно была окрашена красителем Hoechst 33342, выявила концентрационно-зависимое усиление флуоресценции Hoechst 33342 в ядрах (рис. 2). Этот результат позволяет заключить, что генистеин, добавленный к клеткам в суб- и микромолярных концентрациях, способен эффективно проникать через интактную плазматическую мембрану и накапливаться в клеточном ядре, обеспечивая

тем самым возможность взаимодействия с хроматином.

Поскольку значительная часть ДНК существует в ядре в виде нуклеосом, было изучено влияние генистеина на структуру нуклеосом и комплексов нуклеосом с ядерными белками. С этой целью были получены несколько видов нуклеосом, отличающихся положением пары флуоресцентных меток (донора и акцептора): в коровой области вблизи границ нуклеосомы (нуклеосомы 2LN_P и 2LN_D с метками соответственно в положениях +13/+91 и +57/+135 п.н.), в коровой области, отдаленной от границы нуклеосомы (нуклеосомы 2LN_M с метками в положениях +35/+112 п.н.) (рис. 3а), и в линкерных участках ДНК (нуклеосомы 2LN_O с метками на расстоянии 10 п.н. от границы нуклеосомы) (рис. 4а). Различные положения меток позволяют изучать структурные изменения, вызываемые полифенолами в различных областях нуклеосомы по изменениям в профилях распределения частиц по величине *E* [34].

Методом *sp*FRET-микроскопии была изучена концентрационная зависимость влияния генистеина на структуру нуклеосом. *E*-профили всех вариантов нуклеосом, меченных в коровой области, характеризуются пиком в области высоких значений *E* (рис. 3б–г), характерным для нуклеосом с нативной укладкой супервитков нуклеосомной ДНК на октамере гистонов. Инкубация нуклеосом с генистеином в концентрации 48–400 мкМ не приводит к существенному изменению *E*-профилей: на рис. 3б–г представлены *E*-профили, измеренные при максимальной исследованной концентрации генистеина — 400 мкМ. Это свидетельствует об отсутствии изменений в структуре нуклеосомной ДНК, вызванных взаимодействием с генистеином.

В то же время генистеин влияет на конформацию линкерных участков ДНК при концентрациях выше 100 мкМ (рис. 4). В согласии с ранее опубликованными данными [36] для нуклеосом характерны по меньшей мере две конформации линкеров, отличающиеся расстоянием между спиралями ДНК (рис. 4в), которым в *E*-профилях соответствуют два пика в области низких и средних значений *E* (рис. 4б). Генистеин вызывает изменение структуры линкерной ДНК, сближая спирали ДНК между собой, и переводит большую часть нуклеосом в конформационное состояние, при котором величина *E* значительно возрастает (рис. 4б). По данным электрофореза образование комплексов нуклеосом с генистеином и структурные изменения в области линкерной ДНК практически не влияют на подвижность нуклеосом в геле (рис. 4в).

Как показано ранее, увеличение величины *E*, вызванное сближением спиралей линкерной ДНК, характерно для образования хроматосом с

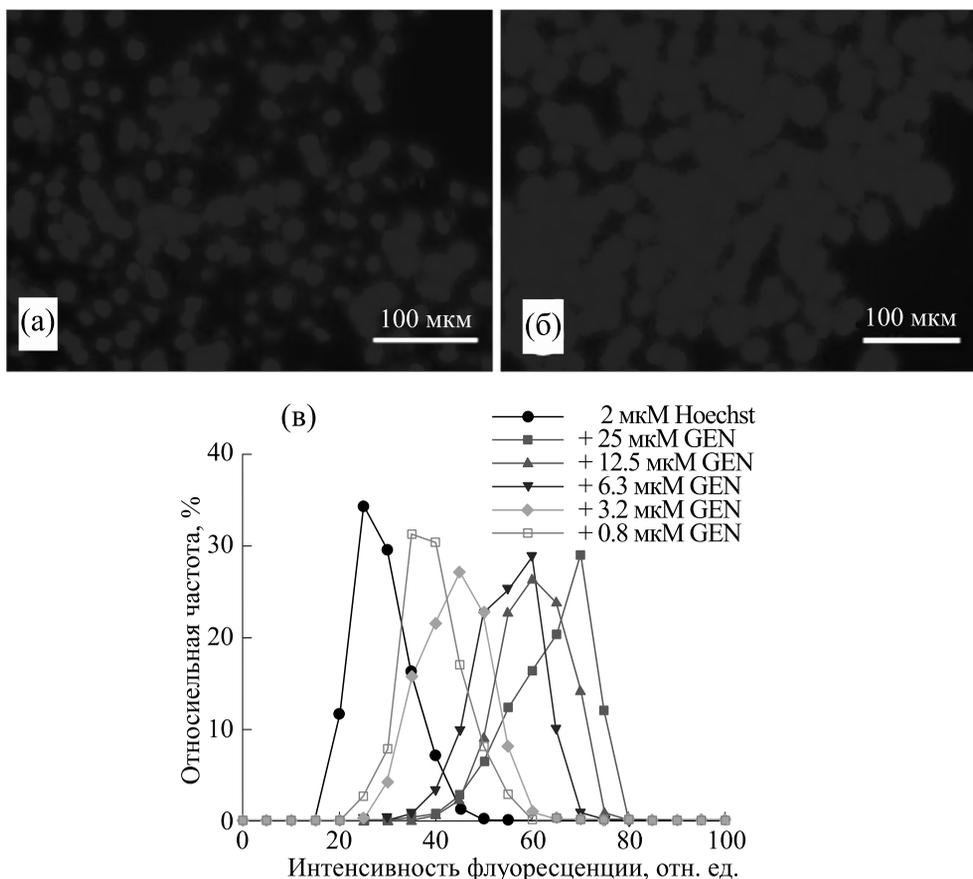


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции Hoechst 33342 в ядрах клеток A549 после инкубации клеток с различными концентрациями генистеина (GEN). (а) и (б) – Флуоресцентные изображения клеток, проинкубированных с 2 мкМ Hoechst 33342 в отсутствие и в присутствии 25 мкМ генистеина соответственно. Масштаб – 100 мкм. (в) – Частотные распределения клеток по интенсивности флуоресценции Hoechst 33342. Клетки инкубировали с 2 мкМ Hoechst 33342 в отсутствие генистеина или в присутствии его различных концентраций. Согласно контрольным экспериментам, собственная флуоресценция генистеина вклада в измеряемую интенсивность флуоресценции Hoechst 33342 не дает.

участием линкерного гистона [34, 36]. Известно, что в результате связывания линкерного гистона в области диадной оси нуклеосом происходит конденсация полинуклеосом в структуры более высокого порядка, а линкерные участки нуклеосом становятся недоступны для коммуникации с другими регуляторными элементами хроматина [37, 38]. Нами исследовано влияние генистеина на структуру хроматосом, образованных гистонами H1.0 и H1.5 (рис. 4б). По данным spFRET-микроскопии, гистоны H1.0 и H1.5 формируют хроматосомы, отличающиеся по конформации линкерной ДНК, на что указывают отличия по величине *E*-пиков хроматосом в *E*-профилях (рис. 4б). Судя по величине *E*, гистон H1.5 сближает спирали линкерной ДНК в области расположения меток так же, как и генистеин, и превосходит по этому параметру гистон H1.0. Генистеин в концентрации 100 мкМ не влияет на *E*-профили обоих типов хроматосом (рис. 4б). Из этого следу-

ет, что генистеин не вызывает диссоциации линкерного гистона H1.0 и изменений конформации в области линкерной ДНК в H1.0-хроматосом. Воздействие генистеина, по-видимому, имеет аналогичный характер и в случае H1.5-хроматосом, но из-за совпадения *E*-профилей данных хроматосом и комплексов нуклеосом с генистеином сделать однозначный вывод сложно.

Взаимодействие генистеина с ДНК в хроматине, по-видимому, лежит в основе обнаруженного ранее ингибирования этим полифенолом ДНК топоизомеразы II [39]. Аналогично можно ожидать, что генистеин способен оказывать влияние на функциональную активность и других ДНК-зависимых ферментов. Для проверки этой гипотезы исследовано влияние генистеина на комплексы нуклеосом с ферментом PARP1 – сенсором разрывов ДНК, инициирующим сборку комплекса репарации повреждений ДНК.

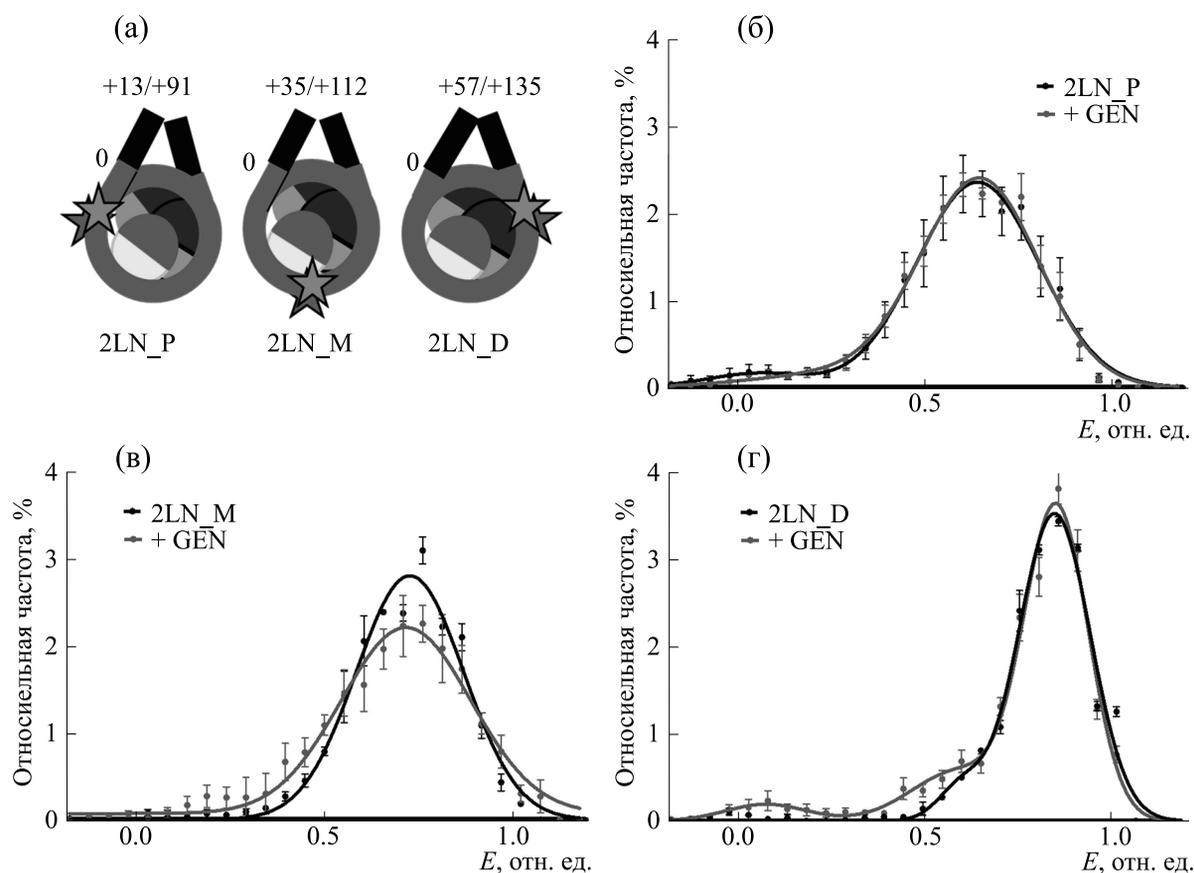


Рис. 3. Влияние генистеина (GEN) на структуру коровой области нуклеосом. (а) – Схемы нуклеосом 2LN_P, 2LN_M и 2LN_D, отличающихся положением флуоресцентных меток (звездочки) в коровой области. (б)–(г) – *E*-профили нуклеосом 2LN_P, 2LN_M и 2LN_D соответственно до и после инкубации с 400 мкМ генистеина.

Ранее было показано, что при образовании комплексов PARP1 реорганизует структуру нуклеосомы, увеличивая расстояние между соседними супервитками ДНК на октамере гистонов, что детектируется как концентрационно-зависимое появление субпопуляции нуклеосом, которой в *E*-профиле соответствует пик с максимумом в области значений $E \sim 0.35\text{--}0.45$ [40]. В согласии с этим результатом в настоящей работе PARP1 вызывал сходные изменения в *E*-профилях нуклеосом, связывая при концентрации 20 нМ часть нуклеосом (рис. 5 а), а при 40 нМ – все нуклеосомы (рис. 5 б). Концентрационно-зависимое образование комплексов нуклеосом с PARP1 подтверждают и данные электрофореза в нативных условиях (рис. 5в). Электрофореграмма свидетельствует, что PARP1 образует несколько типов комплексов с нуклеосомой (рис. 5в), которые, согласно результатам работы [40], отличаются числом связанных молекул PARP1.

Методом spFRET-микроскопии установлено, что генистеин при концентрации 100 и 200 мкМ не оказывает существенного влияния на образо-

вание и структуру комплексов нуклеосом с 20 нМ PARP1, а при концентрации генистеина 400 мкМ он вызывает заметные изменения в *E*-профиле комплексов (рис. 5а). Изменения в *E*-профиле включают в себя уменьшение интенсивности пика в области значений E 0.35–0.60 и появление нового пика с максимумом $E = 0.8$. Аналогичные изменения в *E*-профиле наблюдали при концентрациях генистеина и PARP1, соответственно 400 мкМ и 40 нМ (рис. 5б). С учетом опубликованных ранее данных [40] и данных электрофореза (рис. 5в) эти изменения можно интерпретировать как снижение в присутствии высокой концентрации генистеина доли комплексов нуклеосом, связанных с несколькими молекулами PARP1. На это указывают уменьшение пика с максимумом в области $E \sim 0.45$ (рис. 5а,б) и характерные изменения в электрофореграмме (рис. 5в). Одновременно в растворе увеличивается доля свободных нуклеосом, на что указывают данные электрофореза при 40 нМ PARP1 в присутствии 200 или 400 мкМ генистеина (рис. 5в), при частичном сохранении образования комплексов нуклеосом с одной молекулой PARP1 (рис. 5а–в),

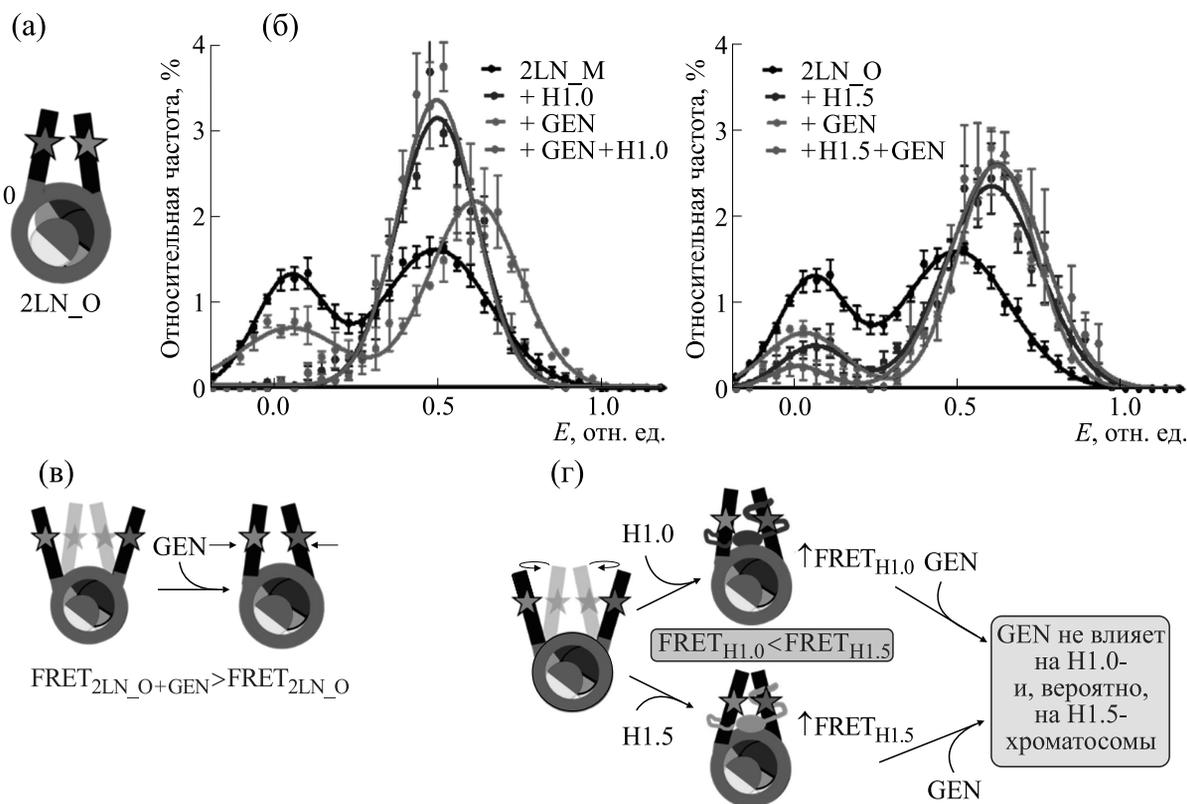


Рис. 4. Влияние генистеина (GEN) на структуру нуклеосом и хроматосом в области линкерной ДНК. (а) – Схема нуклеосом 2LN_O, меченных в области линкерной ДНК. Положения флуоресцентных меток показаны звездочками. (б) – *E*-профили нуклеосом, H1.0-хроматосом (слева) и H1.5-хроматосом (справа) до и после инкубации с генистеином (100 мкМ). (в) – Схема, поясняющая влияние генистеина на структуру нуклеосом в области линкерной ДНК. (г) – Схема, поясняющая структурные изменения в области линкерной ДНК при образовании H1.0- и H1.5-хроматосом и отсутствие влияния генистеина на эти хроматосомы.

для которых в *E*-профилях характерен пик с максимумом $E \sim 0.8$ [40]. Таким образом, генистеин при высокой концентрации затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1.

Образование комплексов с нуклеосомной ДНК активирует PARP1 и в присутствии NAD^+ ведет к поли-АДФ-рибозилированию гистонов и самого PARP1 [40]. Увеличение числа и длины цепочек поли-АДФ-рибозы, прикрепленных к ферменту, способствует диссоциации PARP1 и восстановлению исходной структуры нуклеосом, собранных на донорном хроматине из эритроцитов кур [40]. Аналогично в случае нуклеосом, собранных на октамере рекомбинантных гистонов человека, NAD^+ -зависимое авто-поли-АДФ-рибозилирование PARP1 приводит к увеличению доли свободных нуклеосом (рис. 5в) и появлению в *E*-профиле пика с максимумом в области 0.70–0.75, который свидетельствует о восстановлении исходной структуры у части нуклеосом после диссоциации PARP1 (рис. 5б). При этом в области низких значений *E* наблюдается пик, кото-

рый указывает на то, что часть нуклеосом в процессе поли-АДФ-рибозилирования подвергается структурным перестройкам, приводящим к значительному увеличению расстояния между супервитками нуклеосомной ДНК в области расположения меток, возможно, откручиванию нуклеосомной ДНК от октамера гистонов. Эти структурные изменения обнаружены для нуклеосом, собранных на рекомбинантных гистонах человека (рис. 5б), и не наблюдались для нуклеосом, собранных на донорном хроматине из эритроцитов кур [40]. Возможно, отсутствие странсационных модификаций в рекомбинантных гистонах способствовало более эффективному поли-АДФ-рибозилированию по некоторым сайтам гистонов, что в итоге вызвало реорганизацию структуры ограниченной субпопуляции нуклеосом.

В случае внесения NAD^+ в раствор с комплексами «генистеин–нуклеосома–PARP1» *E*-профиль меняется незначительно, а эффективность образования длинных поли-АДФ-рибозных цепей, как показывают данные вестерн-блоттинга,

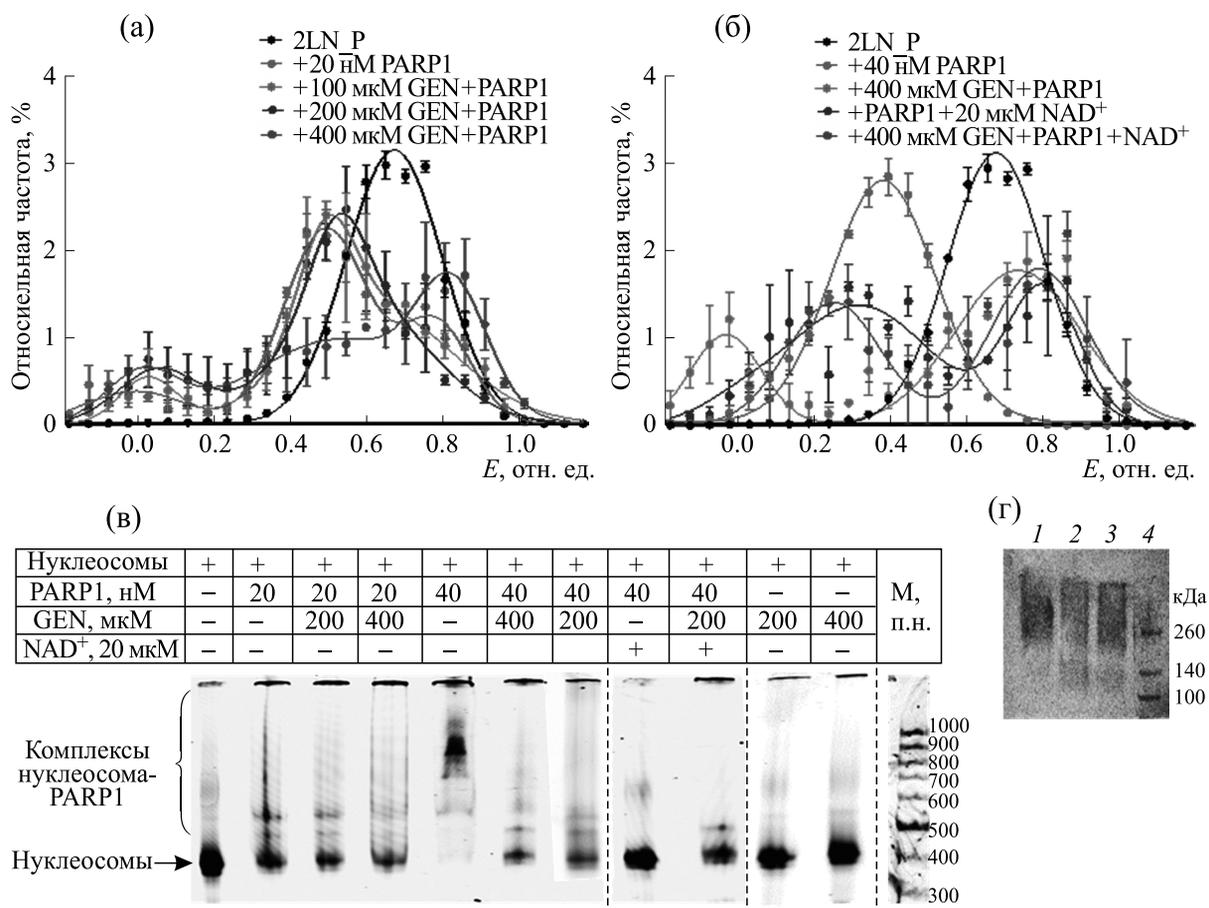


Рис. 5. Изучение влияния генистеина (GEN) на образование и структуру комплексов «PARP1–нуклеосома» и на способность PARP1 к поли-АДФ-рибозилированию. (а) – *E*-профили нуклеосом и комплексов нуклеосом с PARP1 (20 нМ) до и после инкубации с генистеином (100, 200 и 400 мкМ). (б) – *E*-профили нуклеосом и комплексов нуклеосом с PARP1 (40 нМ) до и после инкубации с 400 мкМ генистеина и/или 20 мкМ NAD⁺. (в) – Анализ электрофоретической подвижности комплексов нуклеосом с PARP1 до и после инкубации с генистеином и/или 20 мкМ NAD⁺. (г) – Вестерн-блот с использованием антител 10Н на поли-АДФ-рибозу для комплексов нуклеосома-PARP1 в присутствии NAD⁺ до и после инкубации с генистеином: дорожка 1 – нуклеосомы + PARP1 + NAD⁺, дорожка 2 – нуклеосомы + 400 мкМ генистеина + PARP1 + NAD⁺, дорожка 3 – нуклеосомы + 200 мкМ генистеина + PARP1 + NAD⁺, дорожка 4 – белковые маркеры.

снижается по сравнению с комплексами «нуклеосома–PARP1» в отсутствие генистеина (рис. 5г). Отметим, что образование полимеров поли-АДФ-рибозы изучали с помощью моноклональных антител 10Н, которые связываются с полимерами длиной более 10 остатков АДФ-рибозы [41]. Одна из возможных причин снижения эффективности поли-АДФ-рибозилирования в присутствии генистеина – частичное ингибирование образования комплексов PARP1 с нуклеосомами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генистеин является представителем большой группы биологически активных полифенолов, способных взаимодействовать с ДНК. Проводимые нами исследования [34, 42–44] показывают,

что полифенолы могут значительно отличаться по воздействию на хроматин. Так, полифенолы кверцетин и галлат эпигаллокатехина (EGCG) при микромолярных концентрациях вызывают обратимое откручивание нуклеосомной ДНК от октамера гистонов, не вызывая при этом диссоциацию нуклеосом. Основным типом взаимодействия кверцетина и EGCG с ДНК является их интеркаляция между парами оснований [45–48].

По воздействию на структуру нуклеосом генистеин похож на полифенол ресвератрол, который также не влияет на структуру коровой области нуклеосом, но сближает спирали линкерной ДНК [42]. Известно, что ресвератрол связывается в узкой бороздке ДНК [49–51]. Генистеин отличается по воздействию на хроматосомы от EGCG, который вызывает значительные изменения в

структуре хроматосом в линкерной области ДНК при микромолярных концентрациях, но также не приводит к диссоциации линкерных гистонов [34].

Полученные данные позволяют предположить, что тип взаимодействия полифенола с ДНК может определять характер его воздействия на хроматин. Полифенолы-интеркаляторы, по-видимому, способны реорганизовывать структуру нуклеосом и хроматосом в хроматине, а полифенолы, связывающиеся в узкой бороздке ДНК, на структуру нуклеосом и хроматосом влияют слабо. В то же время оба типа полифенолов вследствие взаимодействия с ДНК могут модулировать функциональную активность ядерных белков, связывающихся с ДНК. Например, EGCG, не мешая связыванию PARP1 с нуклеосомами, подавляет поли-АДФ-рибозилирование соседних белков [52], но не влияет на поли-АДФ-рибозилирование самого PARP1 [34]. Исследованный нами генистеин может ослаблять взаимодействие PARP1 с ДНК, тем самым затрудняя распознавание поврежденных ДНК этим ферментом и их последующую репарацию. Возможно, что воздействие генистеина на раковые клетки, при котором наблюдается образование разрывов ДНК, отчасти вызвано этим свойством полифенола и является одной из причин генистеин-индуцированного апоптоза [12, 22].

Полученные данные свидетельствуют, что отличия биологически активных полифенолов по структуре могут разнонаправленно изменять характер их взаимодействия с хроматином и ядерными белками, что предопределяет необходимость детальных исследований даже очень близких по структуре полифенолов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dixon R. A. and Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*, **60**, 205–211 (2002). DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00116-4
- Liggins J., Bluck L. J., Runswick S., Atkinson C., Coward W. A., and Bingham S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.*, **84**, 717–725 (2000).
- Ji G., Yang Q., Hao J., Guo L., Chen X., Hu J., Leng L., and Jiang Z. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. *Int. Immunopharmacol.*, **11** (6), 762–768 (2011). DOI: 10.1016/j.intimp.2011.01.036
- Jeong J. W., Lee H. H., Han M. H., Kim G. Y., Kim W. J., and Choi Y. H. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chemico-Biological Interactions*. **212**, 30–39 (2014). DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.012
- Mukund V., Mukund D., Sharma V., Mannarapu M., and Alam A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **119**, 13–22 (2017). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.09.004
- Yoon G. A. and Park S. Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. *Nutr. Res. Pract.*, **8**, 618–624 (2014). DOI: 10.4162/nrp.2014.8.6.618
- Mirahmadi S. M., Shahmohammadi A., Roustae A. M., Azadi M. R., Fahanik-Babaei J., Baluchnejadmojarad T., and Roghani M. Soy isoflavone genistein attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairments in the rat via exerting anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Cytokine*, **104**, 151–159 (2018). DOI: 10.1016/j.cyto.2017.10.008
- Rajaei S., Alihemmati Ph. D. A., and Abedelahi Ph. D. A. Antioxidant effect of genistein on ovarian tissue morphology, oxidant and antioxidant activity in rats with induced polycystic ovary syndrome. *Int. J. Reprod. Biomed.*, **17** (1), 11–22 (2019). DOI: 10.18502/ijrm.v17i1.3816
- Yu X., Zhu J., Mi M., Chen W., Pan Q., and Wei M. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med. Oncol.*, **29** (1), 349–357 (2012). DOI: 10.1007/s12032-010-9770-2
- Chen X., Wu Y., Gu J., Liang P., Shen M., Xi J., and Qin J. Anti-invasive effect and pharmacological mechanism of genistein against colorectal cancer. *BioFactors*, **46**, 620–628 (2020). DOI: 10.1002/biof.1627
- Chen T., Wang J., Li M., Wu Q., and Cui S. Genistein Inhibits proliferation and metastasis in human cervical cancer cells through the focal adhesion kinase signaling pathway: a network pharmacology-based in vitro study in hela cells. *Molecules*, **28** (4), 1919 (2023). DOI: 10.3390/molecules28041919
- Xu H., Ma H., Zha L., Li Q., Pan H., and Zhang L. Genistein promotes apoptosis of lung cancer cells through the IMPDH2/AKT1 pathway. *Am. J. Transl. Res.*, **14**, 7040–7051 (2022).

13. Malik P., Singh R., Kumar M., Malik A., and Mukherjee T. K. Understanding the phytoestrogen genistein actions on breast cancer: Insights on estrogen receptor equivalence, pleiotropic essence and emerging paradigms in bioavailability modulation. *Curr. Top. Med. Chem.*, **23** (3), 1395–1413 (2023). DOI: 10.2174/1568026623666230103163023
14. Yu X., Yan J., Li Y., Cheng J., Zheng L., Fu T., and Zhu Y. Inhibition of castration-resistant prostate cancer growth by genistein through suppression of AKR1C3. *Food Nutr. Res.*, **67** (2023). DOI: 10.29219/fnr.v67.9024
15. Yang X., Jiang W., Kong X., Zhou X., Zhu D., and Kong L. Genistein Restricts the epithelial mesenchymal transformation (emt) and stemness of hepatocellular carcinoma via upregulating miR-1275 to inhibit the EIF5A2/PI3K/Akt pathway. *Biology*, **11** (2022).
16. Ji Z., Huo C., and Yang P. Genistein inhibited the proliferation of kidney cancer cells via CDKN2a hypomethylation: role of abnormal apoptosis. *Int. Urol. Nephrol.*, **52** (6), 1049–1055 (2020). DOI: 10.1007/s11255-019-02372-2
17. Park C., Cha H. J., Lee H., Hwang-Bo H., Ji S. Y., Kim M. Y., Hong S. H., Jeong J. W., Han M. H., Choi S. H., Jin C. Y., Kim G. Y., and Choi Y. H. Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by genistein in human bladder cancer T24 cells through inhibition of the ROS-dependent PI3k/Akt signal transduction pathway. *Antioxidants*, **8**, 327 (2019). DOI: 10.3390/antiox8090327
18. Kozak J., Forma A., Czezelewski M., Kozyra P., Sitarz E., Radzikowska-Buchner E., Sitarz M., and Baj J. Inhibition or Reversal of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer: Pharmacological Approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (1), 277 (2020). DOI: 10.3390/ijms22010277
19. Zhang H., Liu G., Zeng X., Wu Y., Yang C., Mei L., Wang Z., and Huang L. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-b-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 2461–2473 (2015). DOI: 10.2147/IJN.S78988
20. Gao J., Xia R., Chen J., Gao J., Luo X., Ke C., Ren C., Li J., and Mi Y. Inhibition of esophageal-carcinoma cell proliferation by genistein via suppression of JAK1/2-STAT3 and AKT/MDM2/p53 signaling pathways. *Aging (Albany NY)*, **12** (7), 6240–6259 (2020). DOI: 10.18632/aging.103019
21. Xu L. and Bergan R. C. Genistein inhibits matrix metalloproteinase type 2 activation and prostate cancer cell invasion by blocking the transforming growth factor β -mediated activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-27-kDa heat shock protein pathway. *Mol. Pharmacol.*, **70** (3), 869–877 (2006). DOI: 10.1124/mol.106.023861
22. Joshi H., Gupta D. S., Abjani N. K., Kaur G., Mohan C. D., Kaur J., Aggarwal D., Rani I., Ramniwas S., Abdulabbas H. S., Gupta M., and Tuli H. S. Genistein: a promising modulator of apoptosis and survival signaling in cancer. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **396**, 2893–2910 (2023). DOI: 10.1007/s00210-023-02550-1
23. Sundaram M. K., Ansari M. Z., Al Mutery A., Ashraf M., Nasab R., Rai S., Rais N., and Hussain A. Genistein Induces alterations of epigenetic modulatory signatures in human cervical cancer cells. *Anti-cancer agents Med. Chem.*, **18**, 412–421 (2018). DOI: 10.2174/1871520617666170918142114
24. Jafari S., Shoghi M., and Khazdair M. R. Pharmacological Effects of Genistein on Cardiovascular Diseases. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2023**, 8250219 (2023). DOI: 10.1155/2023/8250219
25. Zhang X., Huang Y., Zhu H., Liu Z., Zhang L., Li Z., Niu Y., and Zhang H. Genistein microparticles prepared by antisolvent recrystallization with low-speed homogenization process. *Food Chem.*, **408**, 135250 (2023). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.135250
26. Rasheed S., Rehman K., Shahid M., Suhail S., and Akash M. S. H. Therapeutic potentials of genistein: New insights and perspectives. *J. Food Biochem.*, **46** (9), e14228 (2022). DOI: 10.1111/jfbc.14228
27. Serebrenik A. A., Verduyn C. W., and Kaytor M. D. Safety, Pharmacokinetics, and Biomarkers of an amorphous solid dispersion of genistein, a radioprotectant, in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **12** (2), 190–201 (2023). DOI: 10.1002/cpdd.1188
28. Usha S., Johnson I. M., and Malathi R. Modulation of DNA intercalation by resveratrol and genistein. *Mol. Cell. Biochem.*, **284**, 57–64 (2006). DOI: 10.1007/s11010-005-9013-6
29. N'Soukpo-Kossi C. N., Bourassa P., Mandeville J. S., Bekale L., and Tajmir-Riahi H. A. Structural modeling for DNA binding to antioxidants resveratrol, genistein and curcumin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **151**, 69–75 (2015). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.07.007
30. Thastrom A., Lowary P. T., Widlund H. R., Cao H., Kubista M., and Widom J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.*, **288** (2), 213–229 (1999). DOI: 10.1006/jmbi.1999.2686
31. Malyuchenko N. V., Koshkina D. O., Korovina A. N., Gerasimova N. S., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. The Effect of Gosypol on the Structure of Nucleosomes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **75** (3), 142–146 (2020). DOI: 10.3103/S0096392520030050
32. Малюченко Н. В., Андреева Т. В., Гераськина О. В., Герасимова Н. С., Любителев А. В., Фефанов А. В. и Студитский В. М. К вопросу о взаимодействии ресвератрола с нуклеосомами Биофизика. **68** (3), 466–473 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030067
33. Gaykalova D. A., Kulaeva O. I., Bondarenko V. A., and Studitsky V. M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes. *Methods Mol. Biol.*,

- 523, 109–123 (2009). DOI: 10.1007/978-1-59745-190-1_8
34. Andreeva T. V., Maluchenko N. V., Efremenko A. V., Lyubitelev A. V., Korovina A. N., Afonin D. A., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. Epigallocatechin Gallate Affects the Structure of Chromatosomes, Nucleosomes and Their Complexes with PARP1. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (18), 14187 (2023). DOI: 10.3390/ijms241814187
 35. Kudryashova K. S., Chertkov O. V., Nikitin D. V., Pestov N. A., Kulaeva O. I., Efremenko A. V., Solonin A. S., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET. *Methods Mol. Biol.*, **1288**, 395–412 (2015). DOI: 10.1007/978-1-4939-2474-5_23
 36. Lyubitelev A. V., Kudryashova K. S., Mikhaylova M. S., Malyuchenko N. V., Chertkov O. V., Studitsky V. M., Feofanov A. V., and Kirpichnikov M. P. Change in linker DNA conformation upon histone H1.5 binding to nucleosome: Fluorescent microscopy of single complexes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 108–113 (2016). DOI: 10.3103/S0096392516020061
 37. Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter A. R., Papai G., Reymer A., Syed S. H., Lone I. N., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias D. A., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes J. J., Schultz P., Angelov D., Petosa C., and Dimitrov S. Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1. *Mol. Cell*, **66** (5), 729 (2017). DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.018
 38. Hao F., Kale S., Dimitrov S., and Hayes J. J. Unraveling linker histone interactions in nucleosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **71**, 87–93 (2021). DOI: 10.1016/j.sbi.2021.06.001
 39. Markovits J., Linossier C., Fosse P., Couprie J., Pierre J., Jacquemin-Sablon A., Saucier J. M., Le Pecq J. B., and Larsen A. K. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.*, **49** (18), 5111–5117 (1989).
 40. Maluchenko N. V., Nilov D. K., Pushkarev S. V., Kotova E. Y., Gerasimova N. S., Kirpichnikov M. P., Langelier M. F., Pascal J. M., Akhtar M. S., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. Mechanisms of Nucleosome Reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (22), 12127 (2021). DOI: 10.3390/ijms222212127
 41. Kawamitsu H., Hoshino H., Okada H., Miwa M., Momoi H., and Sugimura T. Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry*, **23** (16), 3771–3777 (1984). DOI: 10.1021/bi00311a032
 42. Maluchenko N. V., Andreeva T. V., Geraskina O. V., Gerasimova N. S., Lyubitelev A. V., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. On the interaction of resveratrol with nucleosomes. *Biophysics*, **68**, 369–375 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923030144
 43. Maluchenko N. V., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. PARP-1-associated pathological processes: inhibition by natural polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (21), 11441 (2021). DOI: 10.3390/ijms222111441
 44. Andreeva T., Lyubitelev A., Bondarenko E., Studitsky V., and Feofanov A. Quercetin affects nucleosome structure. *Microscopy and Microanalysis*, **27** (S1), 1740–1741 (2021). DOI: 10.1017/S143192762100636X
 45. Ji C., Yin X., Duan H., and Liang L. Molecular complexes of calf thymus DNA with various bioactive compounds: Formation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, **168**, 775–783 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.135
 46. Galindo-Murillo R., and Cheatham T. E. 3rd. Computational DNA binding studies of (–)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Biomol. Structure & Dynamics*, **36** (13), 3311–3323 (2018). DOI: 10.1080/07391102.2017.1389306
 47. Zheng X., Chen A., Hoshi T., Anzai J., and Li G. Electrochemical studies of (–)-epigallocatechin gallate and its interaction with DNA. *Anal. Bioanal. Chem.*, **386** (6), 1913–1919 (2006). DOI: 10.1007/s00216-006-0752-3
 48. Ghosh K. S., Sahoo B. K., Jana D., and Dasgupta S. Studies on the interaction of copper complexes of (–)-epicatechin gallate and (–)-epigallocatechin gallate with calf thymus DNA. *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1711–1718 (2008).
 49. Kumar S., Kumar P., and Nair M. S. Exploring the binding of resveratrol to a promoter DNA sequence d(CCAATTGG)₂ through multispectroscopic, nuclear magnetic resonance and molecular dynamics studies. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **252**, 119488 (2021). DOI: 10.1016/j.saa.2021.119488
 50. Ji C., Yin X., Duan H., and Liang L. Molecular complexes of calf thymus DNA with various bioactive compounds: Formation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, **168**, 775–783 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.135
 51. Nair M. S., D'Mello S., Pant R., and Poluri K. M. Binding of resveratrol to the minor groove of DNA sequences with AATT and TTAA segments induces differential stability. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **170**, 217–224 (2017).
 52. Alqahtani S., Welton K., Gius J. P., Elmegerhi S., and Kato T. A. The Effect of green and black tea polyphenols on BRCA2 deficient chinese hamster cells by synthetic lethality through PARP inhibition. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1274 (2019). DOI: 10.3390/ijms20061274

Influence of Genistein on the Structure of Nucleosomes and Formation of Complexes With PARP1

T.V. Andreeva*, **A.V. Efremenko****, **A.V. Feofanov*, ****, **A.V. Lyubitelev***, **A.N. Korovina***,
V.M. Studitsky*, ***, **N.V. Malyuchenko***

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

****Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Cottman Ave. 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

The plant-derived polyphenol genistein has high biological activity, which stimulates the study of its applicability for the prevention and treatment of cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Given the ability of genistein to bind DNA, the present work examined the interaction of genistein with chromatosomes, nucleosomes, and nucleosome complexes with poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). It has been established that over a wide range of concentrations, genistein does not affect the structure of nucleosomal DNA, but at high concentrations it causes a change in the structure of linker DNA, bringing DNA helices closer together. In chromatosomes, genistein does not cause dissociation of linker histone and changes in conformation in the region of linker DNA. At high concentrations, genistein hinders the formation of nucleosome complexes with PARP1.

УДК 577.21: 546.795

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТОРИЯ-232 НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ И РАДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2024 г. **Т.В. Рожко***, **О.В. Колесник****, *******, **#**, **А.С. Сачкова******, **Н.Ю. Романова***,
Д. И. Стом*****, **Н.С. Кудряшева****, *******

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России,
ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, 660022, Россия

**Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

***Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

****Томский политехнический университет, просп. Ленина, 30, Томск, 634050, Россия

*****Байкальский музей СО РАН,

Академическая ул., 1, Листвянка Иркутского района Иркутской области, 664520, Россия

#E-mail: olga.kolesnik.krsk@gmail.com

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Изучение низкодозовых эффектов актуально в связи с расширением районов с антропогенной нагрузкой. Торий – один из фонообразующих элементов в природных экосистемах, его содержание может повышаться в окружающей среде в ходе добычи природных ресурсов и работы ТЭЦ. Особый интерес представляют биоэффекты тория в присутствии гуминовых веществ – природных детоксикантов. Целью работы является выявление нейтрализующего эффекта гуминовых веществ в условиях низкодозового воздействия тория-232 (< 0.04 Гр). В качестве модельного биологического объекта выбрана биолюминесцентная система ферментативных реакций, включающая бактериальную люциферазу и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу. Выявлена активация биолюминесценции на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин) и увеличение содержания активных форм кислорода после 50 мин его воздействия. Показана связь интенсивности биолюминесценции и содержания активных форм кислорода (коэффициент корреляции -0.86). Присутствие гуминовых веществ нейтрализует активирующее действие тория и уменьшает содержание активных форм кислорода до контрольного значения. Продемонстрировано влияние гуминовых веществ на скорость НАДН-зависимого ферментативного редокс-процесса. Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов воздействия тория-232 и нейтрализации его влияния на ферментативные процессы.

Ключевые слова: торий-232, биолюминесценция, ферментативный биотест, радиопротекция, гуминовые вещества, активные формы кислорода.

DOI: 10.31857/S0006302924030034, EDN: OGGZUW

Воздействие низкодозового облучения на живые организмы в настоящее время представляет особый интерес в связи с распространением радиоактивного загрязнения [1]. Продукты распада радиоактивных элементов могут воздействовать на сопряженные химические и биологические процессы в природных экосистемах; эти процес-

сы сопровождаются естественным изменением баланса экосистемы в целом.

Торий-232 представляет собой природный альфа-излучатель. Он является одним из наиболее распространенных радиоактивных фонообразующих элементов в природных экосистемах [2]. Природный торий – мягкий серебристо-белый металл, он содержится в следовых количествах в природных фосфатах, полиоксидах и силикатах. В настоящее время торий рассматривается как перспективный энергетический материал; он является ядерным топливным сырьем, при погло-

Сокращения: ФМН – флавиномононуклеотид, АФК – активные формы кислорода, ГВ – гуминовые вещества, КРАБ – комплект реактивов для аналитической биолюминесценции.

шении нейтронов превращается в уран-233, который, в свою очередь, является основой уран-ториевого топливного цикла [3, 4].

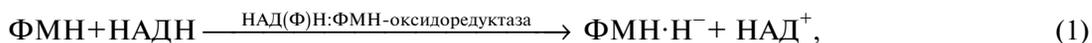
Торий имеет несколько изотопов, как природных, так и искусственных; все они являются радиоактивными. Природный торий содержит 2 изотопа: торий-232 – наиболее распространенная форма тория, долгоживущий материнский источник альфа-излучения (время полураспада – $1.4 \cdot 10^{10}$ лет), родоначальник радиоактивного семейства тория; второй изотоп – торий-228, находящийся в равновесии с торием-232, также является альфа-излучателем с периодом полураспада 1.91 года [5].

Опасность тория как внешнего источника альфа-излучения невысока, но, поскольку торий присутствует в воздухе, воде, почве и биологических материалах, существует риск его попадания в организм во время приема пищи или при контакте с кожей. Инкорпорированный торий как типичный альфа-излучатель представляет большую опасность для живого организма. Попадая в кровь, он может привести к заболеваниям кровеносной системы и к образованию специфических опухолей. Радионуклид высокотоксичен и имеет тенденцию к накоплению в тканях организма [6, 7].

Повышенное внимание к воздействию токсичных веществ на водную экосистему и человека привело к использованию чувствительных организмов в качестве биоиндикаторов для мониторинга и управления загрязнением окружающей среды.

Микроорганизмы являются основной и простейшей частью водных экосистем, внося значительный вклад в баланс экосистемы, а их физиологические показатели служат индикаторами состояния биосферы в целом. Биолюминесцентные системы, основанные на светящихся бактериях, являются удобными биообъектами для изучения токсичности водных сред [8–15], а также биологических эффектов радиации [16–18].

Для мониторинга токсичности окружающей среды широко распространены ферментативный биолюминесцентный биотест, основанный на системе двух сопряженных ферментативных реакций, одна из которых – реакция, катализируемая бактериальной люциферазой. Принцип люциферазных биотестов заключается в обнаружении ингибирующих свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции, что позволяет более детально изучить механизм действия токсиканта [19]. Биолюминесцентная биферментная система включает две ферментативные реакции:



В результате реакции (1), катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой, происходит восстановление флавиномононуклеотида (ФМН) с помощью восстанавливающего реагента – восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). При этом НАДН переходит в окисленную форму никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺), передавая молекуле ФМН протон и два электрона, с образованием депротонированной формы восстановленного флавиномононуклеотида (ФМН·H⁻).

Реакция (2), катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавиномононуклеотид и алифатический альдегид (RCHO) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции испускается квант света. При этом наблюдается длительное свечение, обусловленное множественными оборотами фермента.

В настоящее время описанная бактериальная биферментная система активно используется в

биолюминесцентных анализах в экологии, сельском хозяйстве и других областях [20–22].

Биологические эффекты низкодозовой радиации в настоящее время связывают с образованием активных форм кислорода (АФК) [23, 24]. Под термином «активные формы кислорода» понимают совокупность взаимопревращающихся реакционноспособных форм кислорода [25], у которых периоды полупревращения находятся в диапазоне от наносекунд до часов [26]. Эти формы могут возникать во многих химических и биологических процессах в виде молекул, ионов и свободных радикалов. К группе АФК относятся супероксид анион-радикал (O₂⁻), пероксид водорода (H₂O₂), гидроксильный радикал (·OH), синглетный кислород (¹O₂), гипохлорит (HOCl), гидропероксильный радикал (HOО·), а также окись азота (NO) и пероксинитрит (ONOO⁻), обладающие высокой окислительной активностью.

Традиционно АФК рассматриваются как инициаторы окислительного стресса и повреждений, что приводит к износу тканей и органов, старе-

нию и болезням [24]. АФК постоянно генерируются, изменяются и потребляются во всех живых организмах в результате их аэробного функционирования. Существуют данные о положительном влиянии АФК на физиологию. Показано, что в низких и умеренных дозах АФК способствуют регуляции жизненно важных физиологических функций [3]; они ответственны за пролиферацию, миграцию, дифференцировку и метаболизм [27, 28]. Их роли значительно различаются в зависимости от типов АФК, реакций, в которых они участвуют, и молекул-мишеней, с которыми они реагируют. В биологических процессах АФК являются естественными побочными продуктами метаболических окислительных процессов и играют важную роль в передаче клеточного сигнала и гомеостазе. Участие АФК в биоэффектах наноструктур разного типа в настоящее время активно исследуется [29–31].

Известно, что радиоактивный распад в водных растворах приводит к образованию АФК [32–34], которые могут воздействовать на обитателей водной среды. Существует взаимосвязь между содержанием АФК в радиоактивных растворах и изменением физиологических функций организмов. Так, в работах [33–36] рассматривалась роль АФК в воздействиях радионуклидов на люминесцентные бактерии и их ферментативные реакции.

В работе [37] было изучено влияние радионуклида тория на биолюминесценцию морских бактерий и их ферментативную систему. Было показано, что нитрат тория умеренно активировал биолюминесценцию бактерий и ферментативную систему. (до 50%) при малых дозах воздействия (< 0.1 Гр). Помимо этого, в условиях экспериментов наблюдалось снижение содержания активных форм кислорода.

Биологические реакции на облучение могут меняться в зависимости от молекулярного окружения. Добавление органических молекул может изменять ионное и радикальное состояния водных растворов альфа- и бета-излучающих изотопов, изменяя тем самым окружение водных обитателей и, следовательно, их реакции на растворы радионуклидов. Гуминовые вещества (ГВ), продукты естественной окислительной трансформации органических веществ в почве и донных отложениях, являются важными компонентами окружающей среды и земной коры в целом. Они оказывают решающее влияние на наземные экосистемы, т.к. воздействуют на сложные химические процессы в почве [38], а также регулируют глобальные циклы углерода и азота, рост растений и микроорганизмов [39]. ГВ содержатся в почве (60%), воде и воздухе, соответственно в твердом состоянии, в виде растворов и аэрозолей. Основными наземными источниками ГВ являются природные руды, торф, лигнит.

Гуминовые вещества известны как природные нейтрализаторы токсичности загрязняющих веществ. Их способность детоксицировать водные растворы является предметом интереса для исследователей. Гуминовые вещества представляют собой супрамолекулярные структуры гетерогенных молекул, состоящих из сахаров, жирных кислот, полипептидов, алифатических цепей и ароматических колец, удерживаемых вместе гидрофобными взаимодействиями и водородными связями [40]. Предполагается, что радиопротекторный эффект ГВ связан с их комплексообразующими и окислительно-восстановительными способностями, приводящими к снижению концентрации свободного токсического соединения в водных растворах [41, 42]. Кроме того, ГВ способны интенсифицировать физиологические функции организмов, поэтому в последнее время их детоксицирующий эффект рассматривается как более сложный, имеющий двойную природу – внешнюю и внутреннюю по отношению к организму [42–44]. В настоящее время реагирование организмов на токсичные соединения в присутствии ГВ является предметом внимания биофизиков и токсикологов, в частности, при изучении радиопротекторной активности ГВ [36, 45–47].

Целью данной работы является выявление детоксицирующего эффекта ГВ в растворах тория-232 в условиях низкодозового облучения; поглощенная доза не превышала 0.04 Гр. В качестве модельного биологического объекта выбрана биолюминесцентная ферментативная система, которая ответственна за свечение морских бактерий. Рассмотрено влияние ГВ на интенсивность биолюминесценции, содержание АФК и скорости НАДН-зависимой ферментативной реакции (1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе использовали восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (LLC, США), флавиномононуклеотид (Sigma, Франция), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия).

Источником альфа-излучения служил азотно-кислый торий-232 ($\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) со следующими паспортными данными: содержание основного вещества (не менее) – 98.6%, сульфаты SO_4^{-2} – 0.005%, хлориды Cl^- – 0.002%, железо (Fe), церий (Ce) – 0.05%, оксид фосфора (P_2O_5) – 0.005%, Al, Ca, Mg – 0.05%.

Комплект реактивов для аналитической биолюминесценции (КРАБ) включает лиофилизированные препараты люциферазы *Photobacterium leiognathi* (0.5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* (0.15 ед. активности). Для приготовления раствора препарата ферментов

КРАБ во флакон вносили калий-фосфатный буфер (0.05M, pH 6.8).

В работе использовали угольные гуминоподобные вещества (препарат «Гумат-80» (ООО «Гумат», Иркутск, Россия)). Препарат получен механохимической реакцией бурого окисленного угля (Черемховское месторождение, Россия) со щелочью (KOH, NaOH) [48]. Характеристики препарата: гуминовые кислоты $\approx 85\%$, растворимый калий (K_2O) – 9%, Fe – 1%, вода – 5%, pH 8–9 в 1% водном растворе. Элементный состав используемого препарата: C – 64.5%, N_2 – 4.2%, N_2 – 2.3%, O_2 – 29.0%.

Для регистрации кинетики биолюминесцентного и хемилюминесцентного сигналов был использован планшетный люминометр Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corp., США).

Скорости окисления NADH определяли по изменению оптической плотности раствора на спектрофотометре UVIKON-943 (KONTRON Instruments, Italy).

Анализ образцов проводили при комнатной температуре (20°C). Каждое измерение проводили в 15–20 повторностях.

Регистрация биолюминесценции при воздействии тория-232 на ферментативную систему. Для мониторинга воздействия тория использовали биолюминесцентную систему двух связанных реакций, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой.

Контрольный (нерадиоактивный) образец имел следующий состав: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ», 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала $RCNO$, 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Радиоактивные образцы имели следующий состав: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{Th} = 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5}$ и 10^{-3} M), 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала $RCNO$, 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Для оценки влияния тория на ферментативную систему использовали относительную величину – I^{rel} . Для ее расчета максимальную интенсивность биолюминесценции в растворах тория-232, I_{Th} , сопоставляли с максимальной интенсивностью контрольного (нерадиоактивного) образца, I_k :

$$I^{rel} = \frac{I_{Th}}{I_k}$$

Регистрация биолюминесценции при воздействии тория-232 на ферментативную систему в при-

сутствии гуминовых веществ. При исследовании действия гуминовых веществ на ферментативную систему в присутствии тория интенсивность биолюминесценции измеряли в смесях следующего состава: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{Th} = 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5}$ и 10^{-3} M) в присутствии ГВ ($C_{ГВ} = 10^{-4}$ г/л), 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала $RCNO$, 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Для оценки влияния тория на ферментативную систему использовали относительную величину – I^{rel} . Для ее расчета максимальную интенсивность биолюминесценции в растворах тория-232 и гуминовых веществ, $I_{Th+ГВ}$, сопоставляли с максимальной интенсивностью контрольного (нерадиоактивного) образца, I_k :

$$I^{rel} = \frac{I_{Th+ГВ}}{I_k}$$

Исследование содержания АФК при воздействии радионуклида тория-232 на ферментативную систему в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Для оценки содержания АФК в ферментативной системе при воздействии тория-232 в отсутствие и присутствии ГВ использовали хемилюминесцентный люминольный метод. Этот метод определяет интегральное содержание АФК.

Регистрацию максимальной интенсивности хемилюминесценции в контрольных (нерадиоактивных) и радиоактивных образцах в отсутствие и в присутствии ГВ проводили сразу же после регистрации интенсивности биолюминесценции в одних и тех же ячейках добавлением 50 мкл водно-щелочного раствора люминола ($C = 10^{-4}$ M) и 75 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C = 10^{-3}$ M).

Для определения содержания активных форм кислорода в растворах разного состава, предварительно была построена калибровочная кривая зависимости максимальной интенсивности хемилюминесценции от концентрации пероксида водорода (H_2O_2) как одного из представителей активных форм кислорода. Калибровочная кривая приведена ранее в статье [37].

Для оценки содержания активных форм кислорода при воздействии тория-232 в отсутствие гуминовых веществ использовали относительную величину – $A\Phi K^{rel}$, которую определяли выражением:

$$A\Phi K^{rel} = \frac{A\Phi K_{Th}}{A\Phi K_k}$$

где $A\Phi K_{Th}$ – содержание АФК в радиоактивном растворе, $A\Phi K_k$ – содержание АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце.

Таким же образом оценивали содержание АФК при воздействии тория-232 в присутствии ГВ:

$$A\Phi K^{rel} = \frac{A\Phi K_{Th+ГВ}}{A\Phi K_k},$$

где $A\Phi K_{Th+ГВ}$ – содержание АФК в радиоактивном растворе в присутствии гуминовых веществ; $A\Phi K_k$ – содержание АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце.

Измерение скорости окисления НАДН в растворах тория в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Влияние тория-232 на скорость окисления НАДН исследовали с использованием растворов, включающих: НАДН ($C = 4 \cdot 10^{-4}$ М), калий-фосфатный буфер ($C = 0.05$ М, рН 6.8), препарат ферментов КРАБ, ФМН ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ М), торий-232 ($C = 10^{-7}$ М), гуминовые вещества ($C = 10^{-4}$ г/л).

Скорость окисления НАДН (V) рассчитывали как:

$$V = -\frac{\Delta C}{\Delta t},$$

где Δt – изменение времени (10 мин), ΔC – изменение концентрации НАДН, высчитываемое по формуле:

$$\Delta C = \frac{\Delta D}{\epsilon l},$$

где ΔD – изменение оптической плотности, ϵ – молярный коэффициент экстинкции на длине волны 340 нм ($8250 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$), l – оптический путь света в растворе (1 см).

Статистическая обработка. Чтобы оценить зависимость между относительной интенсивностью биолюминесценции (I^{rel}) и содержанием АФК ($A\Phi K^{rel}$), была проанализирована статистическая корреляционная связь между этими признаками: рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена – r [49]. Применение рангового метода было оправдано отсутствием нормального распределения интенсивности биолюминесценции и содержания АФК, а также ограниченным набором данных. Сеты данных распределения во времени по каждому типу образца (для каждой концентрации тория-232) проверялись в программе Statistica 6.0 методами Шапиро–Уилка и Лиллиефорса (расчетные типы тестов, позволяющие оценивать нормальность для малого объема выборки), а также построением в этой же программе нормально-вероятностных графиков (косвенно-графический тест). Все три

метода дали отсутствие нормального распределения.

В результате расчета непараметрического коэффициента корреляции Спирмена в программе Statistica 6.0 получены значения r и уровень значимости нулевой гипотезы p ; пороговое значение p было установлено на уровне 0.05, сравнение проводилось автоматически.

Для представления данных на рисунках рассчитывали медианы и интерквартильные интервалы Me [0.25;0.75]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с использованием пакетов прикладных программ MS Office (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие тория-232 на биолюминесценцию ферментативной системы в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Проанализировано влияние тория-232 и гуминовых веществ (ГВ) на биолюминесценцию ферментативной системы (рис. 1). Во всех случаях доза облучения ферментативной системы не превышала 0.04 Гр. Использование более концентрированных растворов тория было ограничено необходимостью поддержания оптимальной кислотности среды в ферментативной системе [37].

Из рис. 1а видно, что кинетические кривые в отсутствие ГВ немонотонны. На начальном этапе воздействия тория наблюдается стадия активации биолюминесценции ($I^{rel} > 1$). Наличие активации указывает на применимость модели гормезиса [50, 51] к эффекту тория. Схожую активацию биолюминесценции в присутствии тория-232 наблюдали ранее и для люминесцентных бактерий, т.е. для клеточной системы [37]. Вероятно, активация ферментативной системы вносит вклад в низкоконцентрационные активационные эффекты тория-232 для клеточных организмов.

На рис. 1б приведены кинетики биолюминесценции ферментативной системы в растворах тория-232 в присутствии ГВ. Для экспериментов выбрана концентрация ГВ, равная 10^{-4} г/л, не влияющая на интенсивность биолюминесценции биферментной системы контрольного раствора (без радионуклида). Как видно из сравнения рис. 1а и 1б, гуминовые вещества смещают кинетические кривые к контролю ($I^{rel} \approx 1$, рис. 1б), тем самым нейтрализуя воздействие тория на ферментативную систему.

Содержание активных форм кислорода при воздействии тория-232 на ферментативную систему в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Изучено содержание АФК в ферментативной систе-

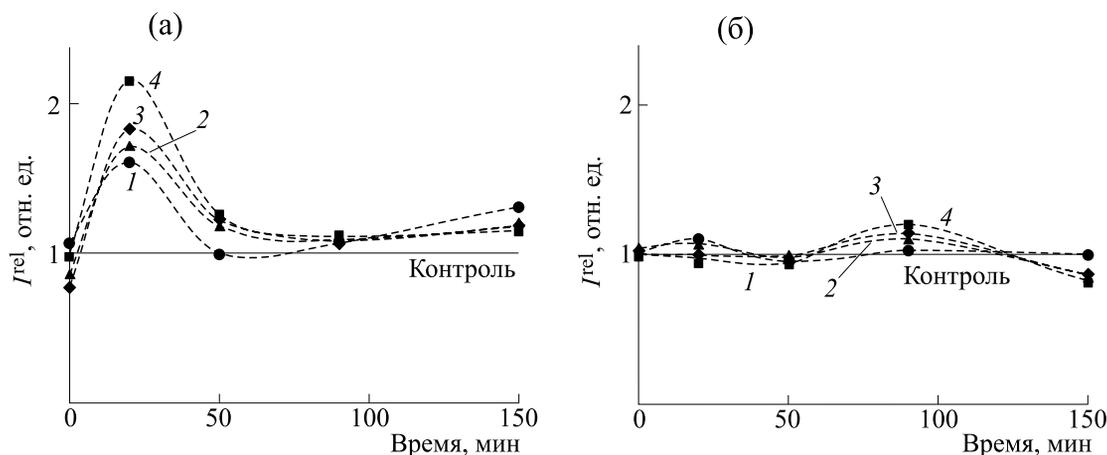


Рис. 1. Кинетика свечения ферментативной системы в растворах тория-232 в отсутствие (а) и в присутствии (б) гуминовых веществ ($C = 10^{-4}$ г/л). Концентрации тория: кривая 1 – 10^{-9} М, кривая 2 – 10^{-7} М, кривая 3 – 10^{-5} М, кривая 4 – 10^{-3} М. Для значений I^{rel} отклонения от медианы 1 и 3 квартилей не превышают 1%.

ме в присутствии тория различной концентрации (рис. 2).

Из рис. 2а виден нелинейный отклик содержания АФК в ферментативной системе: при времени регистрации 90 мин наблюдали увеличение содержания АФК по сравнению с контролем ($A\Phi K^{\text{rel}} > 1$). При этом при высоких концентрациях тория (10^{-5} и 10^{-3} М) содержание АФК увеличивается в 12 раз по сравнению с контролем, при концентрации 10^{-7} М – в 4 раза, а наименьшая концентрация (10^{-9} М) не изменяет содержания АФК в течение всего времени воздействия тория ($A\Phi K^{\text{rel}}$ близко к 1). При малых временах воздействия тория (до 50 мин) наблюдали умеренное (до 30%) снижение содержания АФК.

Из сравнения рис. 1а и 2а видно, что эффекты тория-232 в ферментативной системе разнесены во времени: торий увеличивает интенсивность биолуминесценции (I^{rel}) в начальный промежуток времени воздействия, а содержание АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$) – после 50 мин наблюдения. Оба эффекта являются локальными, т.е. стремятся к контрольным значениям с увеличением времени воздействия.

Как видно из рис. 2б, воздействие тория на ферментативную систему в присутствии гуминовых веществ практически не изменяет содержания АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$ близко к 1). Таким образом, как и в случае интенсивности биолуминесценции (рис. 1б), мы наблюдаем нейтрализацию эффекта тория гуминовыми веществами.

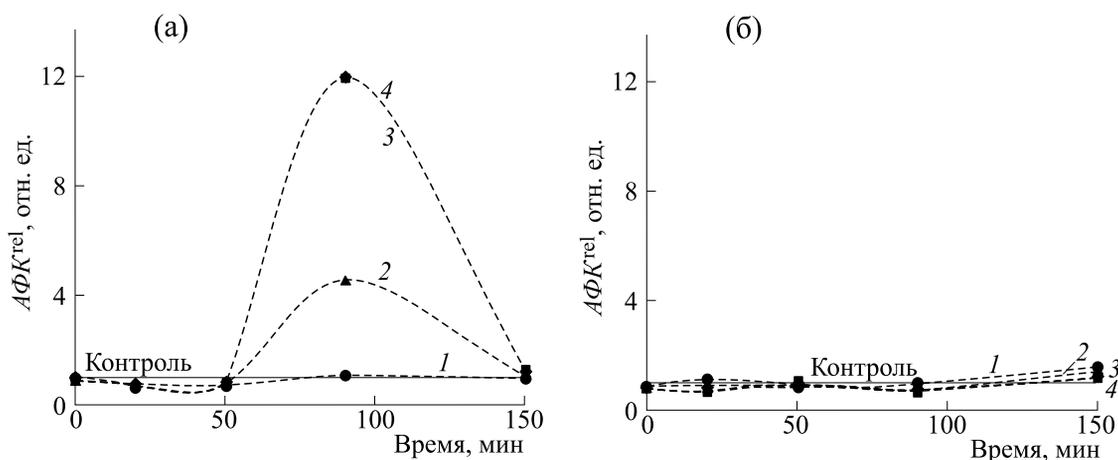


Рис. 2. Относительное содержание АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$) в ферментативной системе при воздействии тория-232 в отсутствие (а) и в присутствии (б) гуминовых веществ ($C = 10^{-4}$ г/л). Концентрации тория: кривая 1 – 10^{-9} М, кривая 2 – 10^{-7} М, кривая 3 – 10^{-5} М, кривая 4 – 10^{-3} М. Концентрация АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце – $9.1 \cdot 10^{-7}$ М. Для значений $A\Phi K^{\text{rel}}$ отклонения от медианы 1 и 3 квартилей не превышают 5%.

Таблица 1. Коэффициенты корреляции r между зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от времени в ферментативной системе в присутствии тория-232

Концентрация тория-232, М	0 (контроль)	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
r	-0.86	-0.79	-0.64	-0.64	-0.43

Следует отметить, что концентрация АФК в ферментативной системе в отсутствие тория-232 не изменяется при добавлении ГВ и стабильна во времени.

Корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК. Были рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена, r , между зависимостями относительной интенсивности биолюминесценции (I^{rel}) и содержания АФК ($AФK^{rel}$) от времени в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных растворах.

Значения r в растворах тория-232 в отсутствие гуминовых веществ указаны в табл. 1.

Результаты показывают значимую ($p < 0.05$) отрицательную корреляцию, т.е. обратную связь между интенсивностью биолюминесценции (I^{rel}) и содержанием АФК ($AФK^{rel}$) в ферментативной системе. Величины r свидетельствуют о высоких и умеренных корреляциях. Этот результат можно связать со следующими процессами в биолюминесцентной ферментативной системе [52, 53]:

(1) Потребление молекулярного кислорода в реакции бактериальной люциферазы со сдвигом равновесия в системе « O_2 – АФК». Этот процесс, вероятно, ответственен за активацию биолюминесценции на начальном этапе воздействия тория (до 50 мин, $I^{rel} > 1$, рис. 1а) и одновременное снижение на 30% содержания АФК ($AФK^{rel} < 1$, рис. 2а).

(2) Накопление пероксида водорода (предшественника АФК) в биолюминесцентной ферментативной системе в темновых путях, не связанных с излучением кванта света. Именно этот процесс, вероятно, является причиной накопления АФК ($AФK^{rel} > 1$, рис. 2а) после 50-минутного воздействия тория при одновременном стремлении интенсивности биолюминесценции к контрольному значению ($I^{rel} \rightarrow 1$, рис. 1а).

Добавление гуминовых веществ (рис. 1б и 2б) нейтрализовало воздействие тория-232 на интенсивность биолюминесценции (I^{rel}) и содержание АФК ($AФK^{rel}$), приблизило эти характеристики к контрольным значениям, сделав отличия от контроля статистически недостоверными. При этом все значения r указывали на высокие отрицатель-

ные корреляции между зависимостями I^{rel} и $AФK^{rel}$ от времени.

Таким образом, гуминовые вещества нейтрализовали воздействие тория-232 на ферментативную систему: они уменьшили активацию биолюминесценции и подавление АФК на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин), а также уменьшили содержание АФК при большем времени воздействия тория-232 (90 мин). Последний эффект гуминовых веществ является проявлением их антиоксидантной активности.

Скорость окисления НАДН в растворе тория в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Изучено влияние тория и гуминовых веществ на скорость окисления НАДН – эндогенного восстановителя в биолюминесцентной ферментативной системе. Окисление НАДН осуществляется в ферментативной системе в соответствии с реакцией (1), представленной выше. Определяли скорости окисления НАДН в ферментативной системе с различным содержанием компонентов – в отсутствие и в присутствии тория-232 и ГВ. Результаты приведены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что скорость автоокисления НАДН достаточно мала – 2.0 М/л. Добавление эндогенного окислителя ФМН к НАДН (реакция (1)) ускоряет окисление НАДН в 8 раз (до 16.2 М/л).

При добавлении тория-232 скорость автоокисления НАДН увеличивается до 6.1 М/л. Добавление тория-232 в реакцию (1) значительно увеличивает скорость окисления НАДН – до 26.7 М/л. Последний результат указывает на то, что торий-232 повышает эффективность окислительно-восстановительного ферментативного процесса (реакция (1)), выполняя роль дополнительного катализатора, что приводит к увеличению выхода биолюминесценции в реакции бактериальной люциферазы (реакция (2)). Этот результат объясняет возможность активации биолюминесценции в присутствии тория-232, продемонстрированной на рис. 1а.

Также было проанализировано влияние ГВ на изменение скорости окисления НАДН в присутствии тория-232. Как видно из сравнения второго и третьего столбцов табл. 2, ГВ дополнительно увеличивают как скорость автоокисления НАДН, так и скорость окисления этого вещества в присутствии ФМН (реакция (1)). При этом в соответ-

Таблица 2. Скорости расходования НАДН в ферментативной системе с различным содержанием компонентов в отсутствие и присутствии тория-232

№	Состав системы	V·108, М/л		
		В отсутствие тория-232	В присутствии тория-232	В присутствии тория-232 и ГВ
1	НАДН	2.0 ± 0.3	6.1 ± 0.5	8.8 ± 0.6
2	НАДН+ФМН (реакция (1))	16.2 ± 0.4	26.7 ± 0.7	36.8 ± 0.8

Примечание. Длина волны регистрации оптической плотности 340 нм. Концентрация тория-232 равна 10–7 М, концентрация ГВ – 10–4 г/л.

ствии с этой реакцией система увеличивает скорость наработки субстрата ФМН·Н⁻ для люминесцентной реакции (2) и, следовательно, увеличивает интенсивность биоломинесценции в биферментной системе. Однако мы наблюдаем уменьшение интенсивности биоломинесценции гуминовыми веществами (нейтрализации эффекта активации торием-232, см. рис. 1а,б). Вероятно, другие процессы ответственны за нейтрализацию эффекта тория гуминовыми веществами в ферментативной биоломинесцентной системе. Это может быть, например, расщепление ферментов люциферазы и редуктазы в присутствии гуминовых веществ [54–56].

Таким образом, увеличение интенсивности биоломинесценции ферментативной системы в присутствии тория-232 малых концентраций может быть связано с его каталитической активностью в окислительно-восстановительной реакции оксидоредуктазы (реакция (1)). Нейтрализация эффекта тория-232 гуминовыми веществами (рис. 1а,б) не связана с ускорением реакции (1), а, вероятно, определяется нарушением сопряжения ферментов в биферментной системе в присутствии гуминовых веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение низкодозовых биологических эффектов в настоящее время чрезвычайно актуально в связи с расширением районов радиоактивного загрязнения. Торий – один из самых распространенных фонообразующих элементов в природных экосистемах. Несмотря на распространенность данного элемента, в настоящее время его влияние на живые организмы изучено недостаточно. Для прогнозирования биоэффектов тория в природной среде особый интерес представляет влияние тория на биологические объекты в присутствии детоксикантов природного происхождения, таких как гуминовые вещества. Биоломинесцентные ферментативные биотесты являются оптимальной биотестовой системой

для выявления биохимических механизмов низкодозового воздействия тория.

В работе использована биоломинесцентная система двух ферментативных реакций, ответственная за свечение морских бактерий. Варьировали концентрацию тория-232 в ферментативной системе, определяли интенсивность биоломинесценции и содержание активных форм кислорода. Выявлена активация биоломинесценции (до 100%) на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин), а также 12-кратное увеличение содержания АФК после 50 мин его воздействия. Выявлена отрицательная корреляция между интенсивностью биоломинесценции и содержанием АФК; коэффициент корреляции Спирмена оказался равным –0.86. Показано, что ГВ нейтрализуют активирующее воздействие тория на биоломинесценцию и уменьшают содержание АФК до контрольного значения, проявляя антиоксидантную активность. Продемонстрировано влияние ГВ на скорость НАДН-зависимого ферментативного редокс-процесса.

Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов воздействия тория-232 и возможности нейтрализации его воздействий на ферментативные процессы с помощью гуматов – веществ природного происхождения. Логическим продолжением данной работы, ее следующим этапом, должно стать изучение эффектов тория-232 на более сложные биологические системы (клетки, ткани, органы, организмы), а также возможности нейтрализации этих эффектов гуминовыми веществами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2024-0018). Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант № 23-26-10018) и Красноярским краевым фондом науки (проект «Прогнозирование реакции сельскохозяйственных животных на низкоинтенсивную радиацию и

применение радиопротекторов. Экспрессный биоломинесцентный скрининг радиобиологических эффектов»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali Y. F., Cucinotta F. A., Ning-Ang L., and Zhou G. Cancer Risk of Low Dose Ionizing Radiation. *Front. Phys.*, **8**, 234 (2020). DOI: 10.3389/fphy.2020.00234
2. Kulahci F. and Çiçek S. On the determination of transportation, range and distribution characteristics of Uranium-238, Thorium-232 and Potassium-40: a critical review. *Environ. Earth Sci.*, **78** (24), 721 (2019). DOI: 10.1007/s12665-019-8736-8
3. Phaniendra A., Jestadi D. B., and Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.*, **30** (1), 11–26 (2015). DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0
4. Zuo L., Zhou T., Pannell B. K., Ziegler A. C., and Best T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.*, **214** (3), 329–348 (2015). DOI: 10.1111/apha.12515
5. Жерин И. И. и Амелина Г. Н. Торий. в кн. *Химия тория, урана, плутония*, под ред. В. А. Матюха и О. В. Водянкина (Изд. ТПУ, Томск, 2010), сс. 19–24.
6. Hassan S. S. M., Rahman E. M. A. R., El-Subruiti G. M., Kamel A. H., and Diab H. M. Removal of Uranium-238, Thorium-232, and Potassium-40 from Wastewater via Adsorption on Multiwalled Carbon Nanotubes. *ACS Omega*, **7** (14), 12342–12353 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.2c00819
7. Chaudhury D., Sen U., Sahoo B. K., Bhat N. N., Kumara S., Karunakara N., Biswas S., Shenoy S., and Bose B. Thorium promotes lung, liver and kidney damage in BALB/c mouse via alterations in antioxidant systems. *Chem. Biol. Interact.*, **363**, 109977 (2022). DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109977
8. Bulich A. A. and Isenberg D. L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Trans.*, **20** (1), 29 (1981).
9. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A. Shar G. A., Tahir M. A., and Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci. Total Environ.*, **626**, 1295–1309 (2018). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066
10. Ismailov A. D. and Aleskerova L. E. Photobiosensors containing luminescent bacteria. *Biochemistry*, **80**, 733–744 (2015). DOI: 10.1134/S0006297915060085
11. Ventura F. F., Mendes L. F., Oliveira A. G., Bazito R. C., Bechara E. J. H., Freire R. S., and Stevani C. S. Evaluation of Phenolic Compound Toxicity Using a Bioluminescent Assay with the Fungus *Gerronema viridilucens*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **39** (8), 1558–1565 (2020). DOI: 10.1002/etc.4740
12. Li Y., He X., Zhu W. Li H., and Wang W. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. *Anal. Bioanal. Chem.*, **414** (1), 75–83 (2022). DOI: 10.1007/s00216-021-03695-9
13. Syed A. J. and Anderson J. C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 5668–5705 (2021). DOI: 10.1039/D0CS01492C
14. Voon C. H., Yusop N. M., and Khor S. M. The state-of-the-art in bioluminescent whole-cell biosensor technology for detecting various organic compounds in oil and grease content in wastewater: From the lab to the field. *Talanta*, **241**, 123271 (2022). DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123271
15. Ali S. A., Mittal D., and Kaur G. In-situ monitoring of xenobiotics using genetically engineered whole-cell-based microbial biosensors: recent advances and outlook. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 81 (2021); DOI: 10.1007/s11274-021-03024-3
16. Girotti S., Ferri E. N., Fumo M. G., and Maolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*, **608** (1), 2–29 (2008). DOI: 10.1016/j.aca.2007.12.008
17. Kudryasheva N. S. and Rozhko T. V. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. *J. Environ. Radioact.*, **142**, 68–77 (2015). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2015.01.012
18. Kolesnik O. V., Rozhko T. V., and Kudryasheva N. S. Marine Bacteria under Low-Intensity Radioactive Exposure: Model Experiments *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (1), 410 (2023). DOI: 10.3390/ijms24010410
19. Кудряшева Н. С., Кратасюк В. А. и Есимбекова Е. Н. Взаимодействие веществ в биоломинесцентных системах как основа экологического мониторинга. В кн. *Физико-химические основы биоломинесцентного анализа*, под ред. А. Г. Сизых (Краснояр. гос. ун-т., Красноярск, 2002), сс. 63–84.
20. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Berlin, Heidelberg, Springer, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
21. Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kalyabina V. P., and Kratasyuk V. A. Enzymatic Biotesting: Scientific Basis and Application. *Contem. Probl. Ecol.*, **14**, 290–304 (2021). DOI: 10.1134/S1995425521030069
22. Roda A., Guardigli M., Michelini E., and Mirasoli M. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *Trends Analyt. Chem.*, **28** (3), 307–322 (2009). DOI: 10.1016/j.trac.2008.11.015
23. Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A. Kobayashi Y., and Ohnishi T. Vanguards of Paradigm Shift in Ra-

- diation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses. *J. Radiat. Res.*, **48**, 97–106 (2007). DOI: 10.1269/jrr.06090
24. Smith R. W., Wang J., Schültke E., Seymour C. V., Brauer-Krisch E., Laissue J. A., Blattmann H., and Mothersill C. E. Proteomic changes in the rat brain induced by homogenous irradiation and by the bystander effect resulting from high energy synchrotron X-ray microbeams. *Int. J. Radiat. Biol.*, **89**, 118–127 (2013). DOI: 10.3109/09553002.2013.732252
 25. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. *Вестн. Харьковского национального аграрного ун-та. Сер. Биология*, **3** (12), 6–26 (2007).
 26. Su Y., Song H., and Lv Y. Recent advances in chemiluminescence for reactive oxygen species sensing and imaging analysis. *Microchem. J.*, **146**, 83–97 (2019). DOI: 10.1016/j.microc.2018.12.056
 27. Griendling K. K., Touyz R. M., Zweier J. L., Diaklov S., Chilian W., Chen Y.-R., Harrison D. G., and Bhatnagar A. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.*, **119** (5), 39–75 (2016). DOI: 10.1161/RES.000000000000110
 28. Suzen S., Gurer-Orhan H. and Saso L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules*, **22** (1), 181 (2017). DOI: 10.3390/molecules22010181
 29. Sushko E. S., Vnukova N. G., Churilov G. N., and Kudryasheva N. S. Endohedral Gd-Containing Fullerenol: Toxicity, Antioxidant Activity, and Regulation of Reactive Oxygen Species in Cellular and Enzymatic Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (9), 5152 (2022). DOI: 10.3390/ijms23095152
 30. Kicheeva A. G., Sushko E. S., Bondarenko L. S., Kyralieva K. A., Pankratov D. A., Tropkaya N. S., Dzeranov A. A., Dzhardimalieva G. I., Zarelli M., and Kudryasheva N. S. Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization, Bioeffects, and Role of Reactive Oxygen Species in Unicellular and Enzymatic Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2), 1133 (2023). DOI: 10.3390/ijms24021133
 31. Stepin E. A., Sushko E. S., Vnukova N. G., Churilov G. N., Rogova A. V., Tomilin F. N., and Kudryasheva N. S. Effects of Endohedral Gd-Containing Fullerenols with a Different Number of Oxygen Substituents on Bacterial Bioluminescence. *Int. J. Mol. Sci.*, **25** (2), 708 (2024). DOI: 10.3390/ijms25020708
 32. Selivanova M. A., Rozhko T. V., Devyatovskaya A. N., and Kudryasheva N. S. Comparison of chronic low-dose effects of alpha- and beta-emitting radionuclides on marine bacteria. *Cent. Eur. J. Biol.*, **9** (10), 951–959 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0331-0
 33. Alexandrova M., Rozhko T., Vydryakova G., and Kudryasheva N. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of peroxides. *J. Environ. Radioact.*, **102**, 407–411 (2011). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2011.02.011
 34. Azzam E. I., Jay-Gerlin J.-P., and Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, **327** (1-2), 48–60 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
 35. Rozhko T. V., Nogovitsyna E. I., Badun G. A., Lukyanchuk A. N., and Kudryasheva N. S. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells. *J. Environ. Radioact.*, **208-209**, 106035 (2019). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2019.106035
 36. Rozhko T. V., Kolesnik O. V., Badun G. A., Stom D. I., and Kudryasheva N. S. Humic Substances Mitigate the Impact of Tritium on Luminous Marine Bacteria. Involvement of Reactive Oxygen Species. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (18), 6783 (2020). DOI: 10.3390/ijms21186783
 37. Kolesnik O. V., Rozhko T. V., Lapina M. A., Solovyev V. S., Sachkova A. S., and Kudryasheva N. S. Development of Cellular and Enzymatic Bioluminescent Assay Systems to Study Low-Dose Effects of Thorium. *Bioengineering*, **8** (12), 194 (2021). DOI: 10.3390/bioengineering8120194
 38. Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., and Nardi S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signal Behav.*, **5** (6), 635–643 (2010). DOI: 10.4161/psb.5.6.11211
 39. Lipczynska-Kochany E. Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. *Chemosphere*, **202**, 420–437 (2018). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.104
 40. Shah Z. H., Rehman H. M., Akhtar T., Alsamadany H., Hamooh B. T., Mujtaba T., Daur I., Zahrani Y. A., Alzaharani H. A. S., Ali S., Yang S. H., and Chung G. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.*, **9**, 263 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00263
 41. Kudryasheva N. S., Stom D. I., and Tarasova A. S. Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring in vitro. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**, 155 (2015). DOI: 10.1007/s10661-015-4304-1
 42. Bondareva L. and Kudryasheva N. Direct and Indirect Detoxification Effects of Humic Substances. *Agronomy*, **11** (2), 198 (2021). DOI: 10.3390/agronomy11020198
 43. Klocking R. and Helbig B. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. In *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*, Ed. by A. Steinbuchel and M. Hofrichter (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005), pp. 3–16. DOI: 10.1002/3527600035.bpol1013
 44. Жилин Д. М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II). Дис. ... канд. хим. наук (Моск. гос. ун-т имени М. В. Ломоносова, М., 1998).
 45. Rozhko T., Bondareva L., Mogilnaya O., Vydryakova G., Bolsunovsky A., Stom D., and Kudryasheva N. S. Detoxification of AM-241 solutions by humic substances: bioluminescent monitoring. *Anal. Bioanal.*

- Chem.*, **400** (2), 329–334 (2011). DOI: 10.1007/s00216-010-4442-9
46. Goel P. and Dhingra M. Humic Substances: Prospects for Use in Agriculture and Medicine. In *Humic Substances*, Ed. by A. Makan (London, IntechOpen, 2021). DOI: 10.5772/intechopen.99651
47. Shkarupa V. M. and Klymenko S. V. Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients. *Exp. Oncol.*, **38** (2), 108–111 (2016). DOI: 10.31768/2312-8852.2016.38(2):108-111
48. Скрипкина Т. С. Механохимическая модификация структуры гуминовых кислот для получения комплексных соединений. Дис. ... канд. хим. наук (ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, 2018).
49. Gmurman V. *Fundamentals of Probability Theory and Mathematical Statistics* (American Elsevier Publishing Co., 1968).
50. Calabrese E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb. Cell.*, **1** (5), 145–149 (2014). DOI: 10.15698/mic2014.05.145
51. Calabrese E. J. and Selby P. B. Comet assay and hormesis. *Environ. Pollut.*, **341**, 122929 (2024). DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122929
52. Nemtseva E. V. and Kudryasheva N. S. The mechanism of electronic excitation in the bacterial bioluminescent reaction. *Russ. Chem. Rev.*, **76** (1), 101–112 (2007). DOI: 10.1070/RC2007v076n01ABEH003648
53. Hastings J. W. and Gibson Q. H. Intermediates in the Bioluminescent Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, **238** (7), 2537–2554 (1963). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)68004-x
54. Петушков В. Н., Родионова Н. С. и Белобров П. И. Изучение эффективности работы биферментной системы NADH:FMN- оксидоредуктаза-люцифераза светящихся бактерий. *Биохимия*, **50** (3), 401–405 (1985).
55. Tu S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 183–188 (2008). DOI: 10.1039/B713462B
56. O. S. Sutormin, E. V. Nemtseva, D. V. Gulnov, Sukovatyi L. A., Tyrtshnaya Y. S., Lisitsa A. E., and Kratasyuk V. A. Coupling of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain. *Photochem. Photobiol.*, **100** (2), 465–476 (2024). DOI: 10.1111/php.13845

Effects of Thorium-232 on the Bioluminescent Enzymatic System and Radioprotective Activity of Humic Substances

T.V. Rozhko*, **O.V. Kolesnik****, **A.S. Sachkova******, **N.Yu. Romanova***, **D. I. Stom*******, and **N.S. Kudryasheva****, *******

*Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetskii, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Partizana Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

**Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk 660036 Russia

*** Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041

****Tomsk Polytechnic University, prosp. Lenina 30, Tomsk, 634050

*****Baikal Museum, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Listvyanka, Irkutsk district, Irkutsk Region, 664520

Research into the effects of low-dose radiation exposure is relevant due to an increase in the number of areas to which anthropogenic loading has occurred. Thorium is one of the radioactive elements naturally occurring in ecosystems; the amounts of thorium in the environment may be increased due to the activities related to the extraction of natural resources and operation of thermal power plants. Special interest focuses on the biological effects of thorium in the presence of humic substances as natural detoxicants. The aim of this study is to explore whether humic substances exert "mitigating" effects during exposure to thorium-232 at low-doses (< 0.04 Gy). A bioluminescent system of the enzymatic reactions including the bacterial luciferase and NADH:FMN-oxidoreductase has been chosen as a biological object. It was found that the activation of bioluminescence occurred in the initial stage of the exposure (up to 50 min) and production of reactive oxygen species increased after the 50 min exposure of this system to thorium-232. The relationship between the intensity of bioluminescence and the level of reactive oxygen species (correlation coefficient is –0.86) is shown. The addition of humic substances helps to neutralize thorium activity and reduce the level of reactive oxygen species to the control value. The effects of humic substances on the rate of NADH-dependent enzymatic process including redox reactions are shown. The results obtained contribute to the understanding of the mechanisms of the effects of thorium-232 at molecular level and its neutralization effects on the enzymatic processes.

Keywords: thorium-232, bioluminescence, enzyme bioassay, radioprotection, humic substances, reactive oxygen species

УДК 577.325.2

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКИХ СРЕД НА КВАНТОВЫЙ ВЫХОД БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗой

© 2024 г. А.Е. Лисица^{*, #}, Л.А. Суковатый^{*}, В.А. Кратасюк^{*, **}, Е.В. Немцева^{*, **}^{*}Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия^{**}Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия[#]E-mail: ALisitsa@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 06.03.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

На основе данных по нестационарной кинетике биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в средах с полиолами и сахарами с помощью математического моделирования был определен относительный квантовый выход биолюминесценции в этой реакции на молекулу субстратов. Получено, что в некоторых средах относительный квантовый выход на молекулу альдегида растет по сравнению со значением в буфере: на 18% в присутствии глицерина и на 33% – в присутствии сахарозы. Методами молекулярной динамики была проанализирована конформация боковой цепи α His44 – важного для катализа остатка бактериальных люцифераз. Установлено, что в присутствии всех соразтворителей наблюдается повышение вероятности образования оптимальной для катализа конформации этого аминокислотного остатка, что может способствовать наблюдаемому увеличению квантового выхода биолюминесценции изучаемой реакции в вязких средах.

Ключевые слова: бактериальная биолюминесценция, квантовый выход биолюминесценции, люцифераза, эффект среды.

DOI: 10.31857/S0006302924030047, EDN: OFZRCR

Излучение света живыми организмами (биолюминесценция) происходит в результате окислительно-восстановительных реакций, катализируемых специальными ферментами – люциферазами. Биолюминесцентная реакция бактерий представляет собой проходящее через несколько стадий окисление восстановленного флавинонуклеотида (FMNH₂) и длинноцепочечного альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O₂), с образованием окисленной формы флавина (FMN), карбоновой кислоты (RCOOH) и кванта света ($h\nu$) (рис. 1) [1]. Ключевыми интермедиатами реакции считаются комплексы бактериальной люциферазы с FMNH₂ (Интермедиат I), 4а-гидропероксифлавином, FMNOOH (Интермедиат II), 4а-пероксиполуацеталь-флавином (Интермедиат IIА), и 4а-гидроксифлавином, FMNOH (Интермедиат III) [2]. FMNH₂ и Интермедиат II являются неустойчивыми соединениями и в присутствии молекулярного кислорода подвержены темновому распаду с образованием FMN и перекиси водорода [1].

Эффективность биолюминесцентных реакций оценивают с помощью такого параметра, как квантовый выход биолюминесценции Q_{bl} , который равен количеству квантов света, излучаемых на одну молекулу люциферазы или субстрата, вступивших в реакцию, либо на одну молекулу продукта, образовавшегося в реакции [3, 4]. *In vitro* реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, характеризуется довольно низким квантовым выходом биолюминесценции, что, вероятно, обусловлено сложной кинетической схемой и наличием темновых стадий. Так, для реакции, катализируемой люциферазой *Photobacterium phosphoreum*, с деканалем было получено $Q_{bl} = 0.13$ (на молекулу декановой кислоты) [5], а для реакции, катализируемой люциферазой *Photobacterium leiognathi*, с тетрадеканалем было определено $Q_{bl} = 0.21$ (на молекулу миристиновой кислоты) [6]. Низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции бактерий затрудняет ее применение для биолюминесцентной визуализации клеток и заставляет исследователей искать пути увеличения ее яркости, например, путем со-

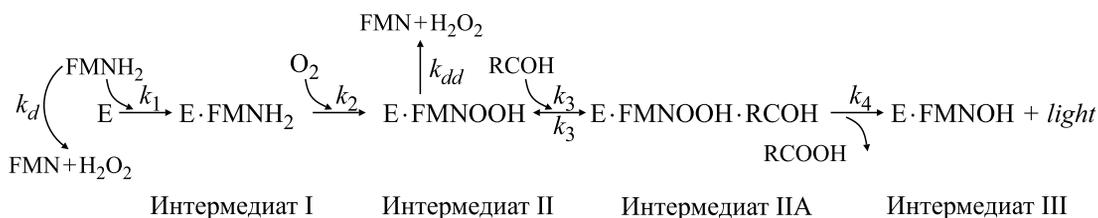


Рис. 1. Кинетическая схема билюминесцентной реакции бактерий: E – люцифераза, остальные обозначения расшифрованы в тексте.

здания химерной люциферазы с присоединенным антенным белком [7].

Варьируя физико-химические условия проведения билюминесцентной реакции (pH, температура, состав среды, и другие), можно наблюдать увеличение или уменьшение интенсивности излучаемого света. Однако такие изменения могут быть обусловлены кинетическими механизмами и не отражать изменение квантового выхода билюминесценции в реакции как такового. В работе [6] было показано, что для реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, с тетрадеканалем присутствие в среде небольших концентраций органических растворителей приводит к изменению отношения испускаемых квантов света к количеству продуцируемых молекул карбоновой кислоты: в присутствии 1% диметилсульфоксида и 0.15% ацетона квантовый выход на молекулу миристиновой кислоты снижается от 0.21 до 0.13 и 0.04 соответственно.

В общем случае влияние конденсированных сред на (био)химические реакции может реализовываться через изменение динамики молекул (скорости конформационных переходов) вследствие вязкостного сопротивления среды. Поэтому вариацию вязкости широко используют для исследования тонкостей механизмов молекулярных трансформаций и движений молекулярных фрагментов в самых разнообразных системах – от ферментативных процессов [8] до молекулярных моторов [9] и стереоселективных химических взаимодействий [10, 11]. Эффективным способом разделения влияния собственно вязкости и других свойств среды оказывается применение широкого спектра соразтворителей, изменяющих вязкость раствора. В наших предыдущих работах [12–14] был изучен эффект вязких сред на основе ряда полиолов и сахаров на скорость отдельных стадий реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, представленных на рис. 1. С повышением вязкости среды были выявлены диффузионные ограничения скоростей некоторых стадий (k_1 , k_d , k_{dd}), но каталитическая константа k_4 оказалась не зависящей от вязкости, проявляя рост в средах с сорбитолом, глюкозой и сахарозой. Однако проведенное детальное исследование кинетических характеристик реакции не позволило

получить в явном виде ответ на вопрос, как изменяется квантовый выход бактериальной билюминесценции в вязких средах.

Целью данной работы было оценить влияние вязких сред на основе полиолов и сахаров на квантовый выход билюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*. Для этого на основе определенных ранее констант скоростей отдельных стадий реакции было рассчитано количество фермента и субстратов, участвующих в реакции в разных средах, и соотнесено с количеством испускаемого света. Это позволило оценить изменение квантового выхода билюминесценции реакции по сравнению со стандартными условиями (буферный раствор).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение количества света, испускаемого в билюминесцентной реакции. Для расчета относительного квантового выхода билюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах с этиленгликолем, глицерином, сорбитолом, глюкозой, сахарозой и декстраном были использованы данные по нестационарной кинетике реакции, полученные ранее [13, 14]. Коротко, методика получения кинетических кривых методом остановленного потока состояла в следующем: при помощи анализатора кинетики быстрых процессов SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) смешивали 1.9 мкМ люциферазы *P. leiognathi* (ИБФ СО РАН) с раствором субстратов – 30 мкМ FMNH₂ и 20–100 мкМ деканала – и регистрировали изменение интенсивности билюминесценции (I_{bl}) в виде вспышки, завершающейся за <15 с (примеры кинетических кривых приведены на рис. 2а). Эксперименты проводили при 20°C в К-Na-фосфатном буфере (pH 6.9, 0.05 М) и в вязких средах (буферных растворах с 10–40 вес. % этиленгликоля, глицерина, сорбитола, глюкозы и сахарозы, или 5–15 вес. % декстрана со средней молекулярной массой 70 кДа).

Интенсивность билюминесценции регистрировали с помощью ФЭУ R6095 (Hamamatsu Photonics, Япония), закрепленного непосредственно

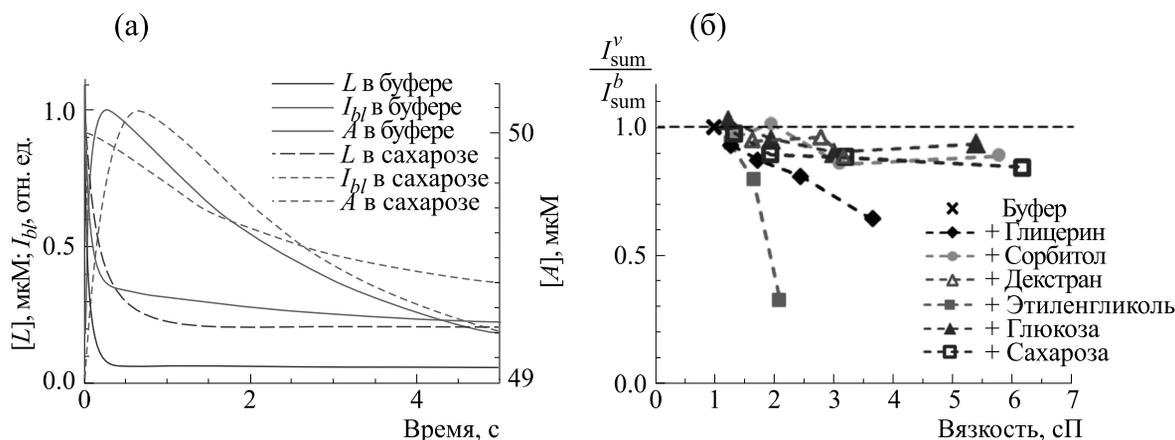


Рис. 2. (а) – Изменение интенсивности биолоуминесценции I_{bl} (нормировано на максимум) и концентрации люциферазы (по левой оси ординат) и деканала (по правой оси ординат) в реакционной смеси в ходе реакции, катализируемой ферментом *P. leiognathi*, в буфере и в сахарозе (40%); приведены данные для эксперимента с 50 μM

деканала. (б) – Относительная интегральная интенсивность биолоуминесцентной реакции I_{sum}^v / I_{sum}^b в разных средах.

на измерительной ячейке прибора, без ограничения спектрального диапазона регистрации. Таким образом, за меру количества света, излученного в реакции, принималось значение интенсивности люминесценции (в условных единицах), полученное во всем спектральном диапазоне (450–550 нм). Интегральную интенсивность, испущенную реакционной смесью за один оборот фермента, I_{sum} , рассчитывали как площадь под кинетической кривой.

Определение относительного квантового выхода биолоуминесценции в вязких средах. Количество люциферазы (L) и субстратов (F – восстановленного флавинмоноклеотида и A – деканала), вступившее в реакцию в разных средах, было рассчитано по изменению их концентраций в ходе реакции, что стало возможным благодаря знанию констант скоростей отдельных стадий реакции. В нашей предыдущей работе [13] детально описано, что для определения констант скоростей отдельных стадий реакции кинетические кривые, полученные в каждой из сред при пяти концентрациях деканала (10, 20, 30, 40 и 50 μM), были аппроксимированы в пакете Scilab (Scilab Enterprises, Франция) с помощью математической модели, разработанной на основе схемы, приведенной на рис. 1. В данной работе кинетические параметры были использованы для определения изменения концентрации компонентов в ходе реакции (рис. 2а), на основе чего было рассчитано количество люциферазы и альдегида, вступивших в реакцию (L_r и A_r), как разность между начальной (в момент времени 0 с) и конечной (в момент времени 10 с)

концентрациями этих компонентов. В условиях постоянного объема реакционной смеси отношение концентраций компонента в вязкой среде и буфере были равны отношению его количеств. Количество FMNH_2 , вступившего в реакцию, считали равным количеству фермента: $F_r = L_r$, что позволило исключить влияние неферментативного окисления FMNH_2 (процесс k_d на рис. 1) на оценку F_r .

Для каждой концентрации соразтворителя был рассчитан относительный квантовый выход биолоуминесценции на одну молекулу люциферазы (Q_L^{rel}) и деканала (Q_A^{rel}) по формулам:

$$Q_L^{\text{rel}} = \frac{I_{sum}^v}{L_r^v} \cdot \frac{I_{sum}^b}{L_r^b} = \frac{I_{sum}^v}{I_{sum}^b} \cdot \frac{L_r^b}{L_r^v}, \quad (1)$$

$$Q_A^{\text{rel}} = \frac{I_{sum}^v}{A_r^v} \cdot \frac{I_{sum}^b}{A_r^b} = \frac{I_{sum}^v}{I_{sum}^b} \cdot \frac{A_r^b}{A_r^v}, \quad (2)$$

где I_{sum}^v и I_{sum}^b – интегральные интенсивности биолоуминесценции в вязкой среде и буфере соответственно (рис. 2б); L_r^v и L_r^b – количество люциферазы, связавшей FMNH_2 , в вязкой среде и буфере соответственно; A_r^v и A_r^b – количество альдегида, связавшегося с Интермедиатом II, в вязкой среде и буфере соответственно. Относительный квантовый выход на одну молекулу FMNH_2 был равен параметру, рассчитанному на одну молекулу люциферазы: $(Q_F^{\text{rel}}) = (Q_L^{\text{rel}})$. Для каждой среды было получено пять значений (Q_A^{rel})

(для концентраций деканала 10, 20, 30, 40 и 50 мкМ), на основе которых были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение.

Расчет молекулярной динамики люциферазы в различных средах. Трехмерная структура бактериальной люциферазы *P. leiognathi* была получена методом реконструирования по гомологии с помощью веб-сервиса SWISS-MODEL [15], как детально описано в работе [14]. Шаблоном являлась кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) [16]. Расчет молекулярной динамики реконструированной структуры люциферазы при температуре 300 К и давлении 10^5 Па был проведен в программном пакете GROMACS 2020.4 [17]. Моделируемая система представляла собой бокс с молекулой люциферазы, окруженной либо только молекулами воды, либо смесью воды с соразтворителями: этиленгликолем (30 вес. %), глицерином (40 вес. %), сорбитолом (40 вес. %), глюкозой (40 вес. %) и сахарозой (40 вес. %). Для описания топологии всех типов атомов в моделируемых системах было использовано силовое поле CHARMM36 [18]. Подготовка систем (нейтрализация заряда, минимизация энергии методом наискорейшего спуска, релаксации системы при изохорно-изотермических и изотермо-изобарических условиях) подробно описана в работе [14]. Расчет молекулярной динамики каждой из систем проводили для 100 нс, с тремя независимыми запусками, включая этапы минимизации и релаксации. Анализ значений углов χ_1 и χ_2 боковой цепи аминокислотного остатка α -His44 проводили с помощью программного пакета MDanalysis [19,20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение квантового выхода биолюминесценции в вязких средах. С использованием математической модели, описывающей многостадийную кинетику реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, было определено влияние вязких сред на количество фактически участвующих в реакции молекул фермента, FMNH₂ и деканала. Ранее было установлено, что в вязких средах замедляются как некоторые стадии основного (светового) пути, так и конкурирующие темновые процессы [12–14], поэтому вопрос о результирующем влиянии сред на концентрацию образующихся интермедиатов реакции не является тривиальным. Расчеты показали, что несмотря на замедление неферментативного окисления FMNH₂ вязкими средами наблюдается снижение количества Интермедиата I в реакции (равного F_T и L_T) по сравнению с буферным раствором (рис.

3а). В присутствии большинства соразтворителей этот эффект не превышает 30%. Однако этиленгликоль в максимальной концентрации (30%) значительно снижает F_T и L_T (на 66%).

В наших предыдущих работах было получено, что конкурирующие стадии с константами скорости k_1 и k_d являются диффузионно-контролируемыми, то есть зависимость их значений от вязкости среды η описывается степенной функцией [12–14]. Однако показатель степенных зависимостей варьирует для разных сред: для $k_d(\eta)$ он равен около -0.84 для всех изученных соразтворителей, в то время как для $k_1(\eta)$ в средах с этиленгликолем и глицерином показатель принимает значения около -1.80 , а в остальных – около -1.00 [14]. Судя по всему, различие показателей степенной зависимости констант скоростей этих процессов от вязкости приводит к тому, что в присутствии соразтворителей меньшее количество молекул люциферазы связывает восстановленный флавиномононуклеотид и впоследствии формирует электронно-возбужденный интермедиат реакции.

Схожая картина наблюдается для количества связавшегося альдегида A_T (рис. 3б): в вязких средах в реакции участвует на $\leq 20\%$ меньше этого субстрата, чем в буфере (за исключением сред с максимальным содержанием глицерина и этиленгликоля, где эффект выражен сильнее). Различия между данными для флавина и альдегида (рис. 3а,б) объясняются тем, что константа ассоциации альдегида (скорость образования Интермедиата II) зависит от концентрации соразтворителей сложным образом и не объясняется диффузионными ограничениями [14].

По формулам (1) и (2) был рассчитан относительный квантовый выход биолюминесценции в реакции на молекулу фермента и субстратов – FMNH₂ и деканала. Полученные значения представлены на рис. 3в,г и в табл. 1. Установлено, что относительный квантовый выход изменяется на $< 33\%$, и это изменение не зависит от вязкости среды как таковой.

Присутствие соразтворителей в среднем увеличивает относительный квантовый выход на молекулу альдегида, при этом наибольший эффект наблюдается для среды с 40%-й сахарозой (рис. 3г). Относительный квантовый выход биолюминесценции на молекулу люциферазы и флавина для некоторых сред принимает значения ≤ 1 (рис. 3в), но это лишь кажущийся эффект, поскольку фактически только часть Интермедиата I в дальнейшем свяжется с альдегидом.

Ранее было показано, что константа скорости формирования электронно-возбужденного интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий (k_d) не зависит от вязкости среды и демон-

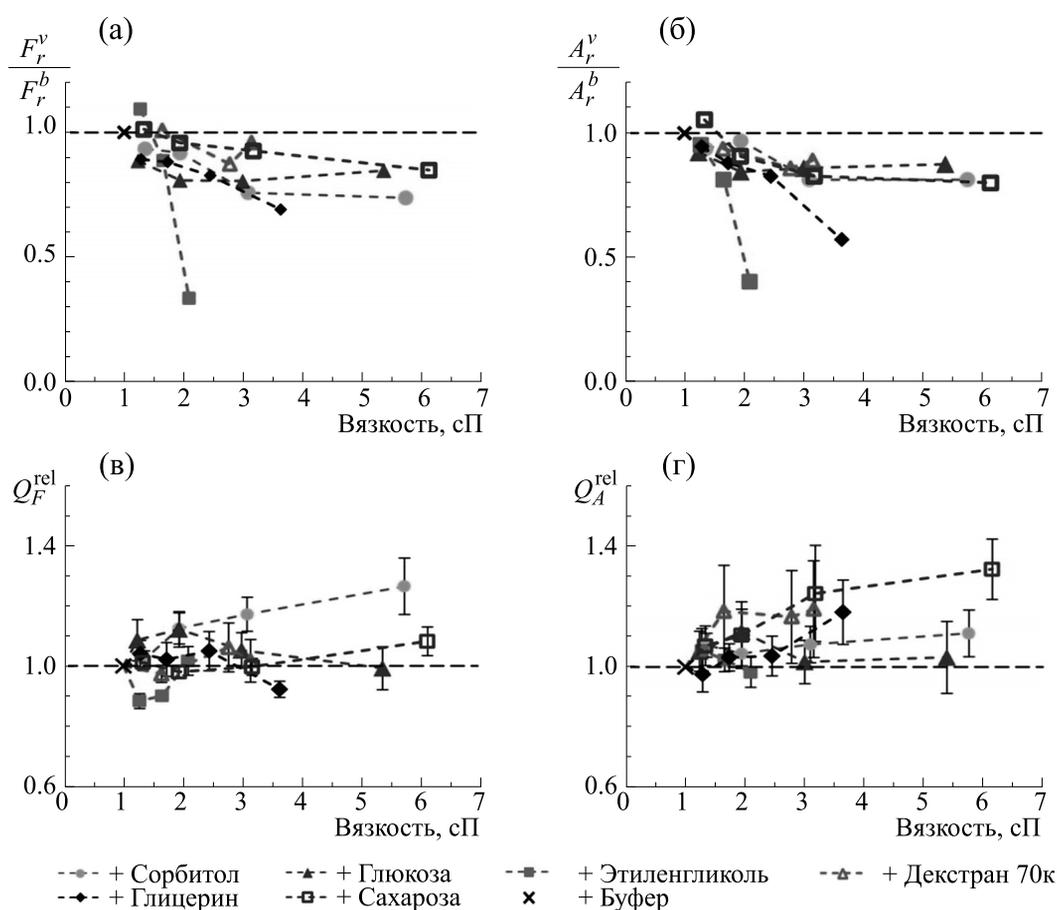


Рис. 3. Зависимость относительного количества FMNH₂, $\frac{F_r^v}{F_r^b}$ (а) и деканала, $\frac{A_r^v}{A_r^b}$ (б), вступивших в реакцию, а также относительного квантового выхода биолюминесценции на молекулу FMNH₂, Q_F^{rel} (в) и деканала, Q_A^{rel} (г) от вязкости среды в присутствии разных полиолов и сахаров. Параметры рассчитаны относительно значений в буфере (вязкость 1 сП).

стрирует специфику относительно выбранного соразтворителя [13, 14]. Так, в средах с этиленгликолем и декстраном наблюдалось уменьшение k_4 , в средах с глицерином влияние отсутствовало, а в присутствии сорбитола, глюкозы и сахарозы происходило увеличение скорости данной стадии. Например, в растворе 40%-й сахарозы k_4 увеличивается на порядок по сравнению с значением в буфере. Отсутствие корреляций между каталитической константой фермента (k_4) и квантовым выходом биолюминесценции в присутствии соразтворителей может говорить о том, что структурные факторы, определяющие высокую скорость реакции и ее высокую эффективность, разные. В частности, на функциональные свойства бактериальных люцифераз влияет изменение средой подвижности мобильной петли фермента, участвующей в стабилизации интермедиатов ре-

акции [21, 22]. Получается, что в условиях повышения вязкости цитоплазмы бактерий поддержание высокого уровня свечения происходит в большей степени за счет увеличения числа оборотов люциферазы, чем за счет повышения эффективности каждого каталитического акта.

В общем случае квантовый выход биолюминесценции, Q_{bl} , представляет собой вероятность высвечивания кванта света в течение одного каталитического акта люциферазы. Он зависит от вероятности образования продукта реакции, определяемой соотношением скоростей основного светового пути и «темновых» процессов, (Q_{chem}), вероятности образования продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии (Q_{ees}) и вероятности излучательной дезактивации электронно-возбужденного эмиттера, что по сути яв-

Таблица 1. Относительный квантовый выход биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, на молекулу фермента (Q_L^{rel}), FMNH₂ (Q_F^{rel}) и деканала (Q_A^{rel}), в вязких средах с разными сорастворителями. Параметры рассчитаны относительно значений в буфере

№	Сорастворитель, вес. %	Относительный квантовый выход биолюминесценции	
		$Q_F^{\text{rel}} = Q_L^{\text{rel}}$, отн. ед.	Q_A^{rel} , отн. ед.
1	Этиленгликоль:		
	10	0.88 ± 0.02	1.06 ± 0.07
	20	0.90 ± 0.01	1.02 ± 0.04
2	Глицерин:	30	1.02 ± 0.05
		10	1.04 ± 0.04
		20	1.02 ± 0.06
3	Сорбитол:	30	1.05 ± 0.06
		40	0.92 ± 0.03
		10	1.02 ± 0.03
4	Глюкоза:	20	1.12 ± 0.05
		30	1.17 ± 0.06
		40	1.26 ± 0.09
5	Сахароза:	10	1.01 ± 0.03
		20	0.98 ± 0.02
		30	1.00 ± 0.03
6	Декстран 70 кДа:	40	1.08 ± 0.05
		5	0.97 ± 0.03
		12.5	1.06 ± 0.08
		15	1.02 ± 0.07

ляется квантовым выходом фотолуминесценции эмиттера (Q_{fl}):

$$Q_{\text{bl}} = Q_{\text{chem}} \cdot Q_{\text{ees}} \cdot Q_{\text{fl}} \quad (3)$$

Кинетическая модель биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, которую мы использовали для исследования влияния вязкости среды (рис. 1), не позволяет разделить вклады условных химической (Q_{chem} и Q_{ees}) и фотофизической (Q_{fl}) стадий в интенсивность испускаемого света.

В таблице 2 представлены опубликованные к настоящему моменту абсолютные значения квантового выхода биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой бактерий. Видно, что наиболее разносторонне изучена реакция, катализируемая люциферазой *A. fischeri*: для альдегидов с длиной цепи 8–14 углеродных атомов бы-

ли получены квантовые выходы от 0.091 до 0.164 [4]. Несмотря на то, что этот фермент также относится к подсемейству «быстрых» люцифераз, как люциферазы *P. phosphoreum* и *P. leiognathi* [23], для последних был зарегистрирован чуть более высокий квантовый выход биолюминесценции (0.20 и 0.21 соответственно). Если использовать эти данные, то можно оценить, что для изученной нами реакции в среде с 40%-й сахарозой квантовый выход биолюминесценции составляет около 0.28.

Влияние сорастворителей на конформацию каталитически важного гистидинового остатка люциферазы. Наши предыдущие исследования структурно-динамических характеристик бактериальной люциферазы в присутствии полиолов и сахаров [12–14] показали, что все сорастворители, за исключением этиленгликоля, не оказывают заметного влияния ни на укладку белковой

Таблица 2. Абсолютные значения квантового выхода биолюминесценции, определенные к настоящему времени для разных видов бактериальных люцифераз

№	Люцифераза	Компонент, по которому определяли квантовый выход	Q_{bl}
1.	<i>Aliivibrio fischeri</i>	FMNH ₂	0.3 [26], 0.28 [27], 0.047* [28]
		H ₂ O ₂	0.12* [28]
		Декановая кислота	0.13* [5]
		Гексаналь	0.002 [4]
		Октаналь	0.091 [4]
		Нонаналь	0.161 [4]
		Деканаль	0.155 [4], 0.10* [28]
		Ундеканаль	0.144 [4]
		Додеканаль	0.150 [4]
		Тетрадеканаль	0.164 [4]
2.	<i>P. phosphoreum</i>	Люцифераза	0.2 [#] [3,29]
3.	<i>P. leiognathi</i>	Миристиновая кислота	0.21* [6]
4.	<i>Vibrio harveyi</i>	Интермедиат II	0.16 ^{&} , 0.2 [@] [30]

Примечание. * – По люминольному стандарту; # – по радиоактивному стандарту; & – для интермедиата, выделенного при отрицательных температурах; @ – для интермедиата, выделенного при 0°C.

глобулы (по таким параметрам, как радиус инерции белка, площадь поверхности, доступной растворителю, и др.), ни на динамику (по такому параметру, как среднеквадратичная флуктуация C_a-атомов). Анализ конформации боковых цепей аминокислотных остатков, участвующих в связывании субстратов, также не выявил влияния соразтворителей [24]. Это выглядит закономерным результатом, поскольку исследованные соразтворители являются природными осмолитами – молекулами с защитной функцией, которые накапливаются клетками в неблагоприятных условиях среды [25].

В данной работе с помощью методов молекулярной динамики для люциферазы, окруженной молекулами воды и смесью воды с соразтворителями, мы проанализировали конформацию боковой цепи α His44, располагающегося глубоко в полости активного центра фермента. В недавней работе [31] было показано, что образование 4а-пероксиполуацеталь-флавина (Интермедиата II) в активном центре бактериальной люциферазы происходит с участием этого аминокислотного остатка, который вместе с молекулой воды выступает в роли акцептора протона. Распределение двугранных углов χ_1 и χ_2 α His44 в ходе молекулярной динамики в разных модельных системах представлено на рис. 4. Было получено, что, когда белок окружен только молекулами воды, гистидин может находиться со сходной вероятностью в двух конформациях: конформация 1 с углами χ_1 и

χ_2 около 200° и 90° соответственно и конформация 2 – с углами χ_1 и χ_2 около 280° и 270° соответственно (рис. 4а). α His44 является высоко консервативным аминокислотным остатком для бактериальных люцифераз [23], играющим важную роль в их биолюминесцентной активности [32]. Конформация 1 соответствует ориентации боковой цепи этого остатка в кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC), отмеченной на рис. 4 треугольным маркером [16]. QM/ММ расчеты для этой структуры показали, что такое положение является наиболее оптимальным для процесса образования электронно-возбужденного 4а-гидроксифлавина из 4а-пероксиполуацеталь-флавина [33].

Мы установили, что в присутствии всех соразтворителей наблюдается снижение вероятности образования конформации 2 (рис. 4б–е). В присутствии же этиленгликоля происходит расщепление конформации 1 на две подгруппы по углу χ_1 (рис. 4б). Учитывая, что именно конформация 1 является наиболее оптимальной для каталитической активности люциферазы, можно предположить, что большая вероятность этого состояния в средах с соразтворителями по сравнению с водным окружением способствует наблюдаемому увеличению квантового выхода биолюминесценции в изучаемой реакции. Наш предыдущий анализ присутствия молекул соразтворителей в полости активного центра показал, что ко дну полости, где расположен α His44, имеют доступ только

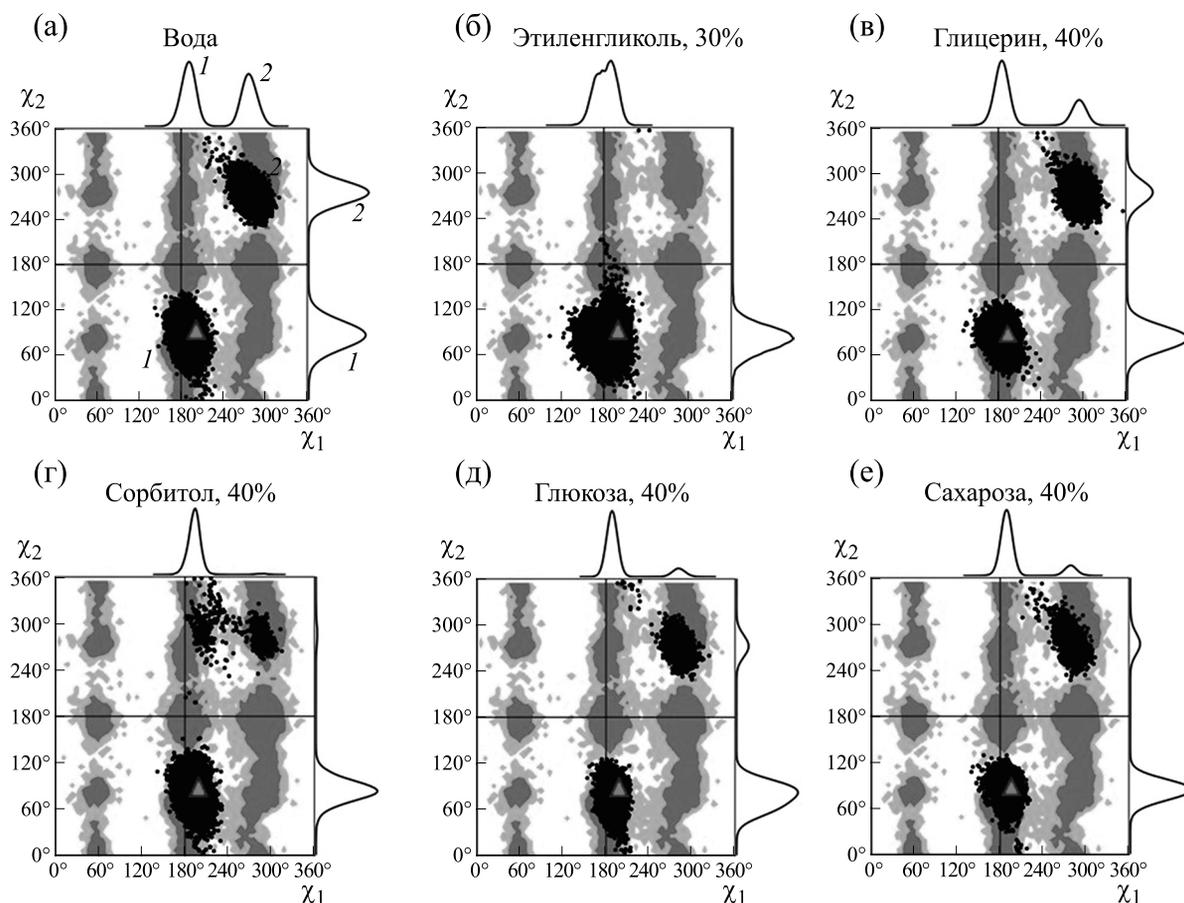


Рис. 4. Вариация двугранных углов χ_1 и χ_2 α His44 люциферазы *P. leiognathi* в ходе молекулярной динамики в разных модельных системах в двумерном представлении (точки) и в виде частотного распределения (линии около контура рисунка): (а) – вода; (б) – этиленгликоль, 30%; (в) – глицерин, 40%; (г) – сорбитол, 40%; (д) – глюкоза, 40%; (е) – сахароза, 40%. Для каждой модели показаны результаты трех повторов (3000 фреймов). Треугольным маркером отмечена конформация гистидина в кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) ($\chi_1 = 185^\circ$, $\chi_2 = 90^\circ$). Синие поля – доступное положение боковых цепей любых аминокислотных остатков согласно библиотеке [34].

самые маленькие соразтворители – этиленгликоль и глицерин [14]. Сорбитол и глюкоза могут подойти близко (на расстояние образования водородной связи) только к менее углубленным участкам связывания флавина, а самая массивная молекула сахарозы не способна проникать в полость активного центра и располагается около ее входа [14]. Таким образом, оказалось, что физическое присутствие молекул соразтворителей в непосредственной близости от исследованного гистидина не является необходимым условием для влияния среды на его конформацию. Влияние может быть опосредованным, через цепочку взаимодействующих аминокислотных остатков или путем воздействия на мобильность и структуру водородных связей молекул воды в активном центре.

Среди изученных соразтворителей наибольший эффект на биоломинесцентную реакцию оказывал этиленгликоль: при его максимальной концентрации (30%) наблюдалось значительное снижение количества образовавшихся интермедиатов (рис. 3а,б) и, как следствие, интегральной интенсивности биоломинесценции (рис. 2б). Ранее мы показали, что в присутствии этого полиола происходит изменение структуры бактериальной люциферазы (увеличивается радиус инерции и площадь поверхности, доступной растворителю) [14], что, вероятно, связано с маленьким молекулярным размером и высокой долей гидрофобной поверхности этого соединения. Кроме того, было показано, что этиленгликоль лучше всех остальных соразтворителей проникает в полость активного центра фермента, достигая глубоко лежащих сайтов связывания флавина [24], что также вносит вклад в эффекты этого сораз-

творителя на биолюминесцентную реакцию бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы сравнили влияние вязких сред на основе полиолов и сахаров на кинетические свойства биолюминесцентной реакции бактерий (скорости отдельных стадий) и эффективность образования света в ходе катализа (квантовый выход биолюминесценции). Для этого было рассчитано относительное количество субстратов, участвующих в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в разных средах, и проведена оценка количества света, излученного на одну молекулу субстрата, относительно реакции в невязком буферном растворе. Ранее было показано, что в вязких средах с сорбитолом, глюкозой и сахарозой наблюдается увеличение скорости катализа. Однако оценка квантового выхода биолюминесценции показала гораздо более слабое его увеличение в исследованных средах. Наибольший эффект на относительный квантовый выход на молекулу альдегида (увеличение на 33%) оказывает среда с сахарозой — самым массивным из использованных низкомолекулярных сорастворителей. Для оценки влияния сорастворителей на конформацию каталитически важных аминокислотных остатков активного центра люциферазы с помощью методов молекулярной динамики была рассмотрена ориентация боковой группы α His44 фермента в разных средах. Анализ показал, что в присутствии всех полиолов и сахаров наблюдается увеличение вероятности нахождения гистидина в более выгодной для катализа конформации. При этом не важно, приближается ли сорастворитель к гистидиновому остатку на расстояние водородной связи (как этиленгликоль или глицерин) или не имеет никакого доступа в полость активного центра (как сахароза).

В целом, результаты проведенного исследования говорят о том, что в условиях повышения вязкости цитоплазмы бактерий поддержание высокого уровня свечения может происходить в большей степени за счет увеличения числа оборотов люциферазы, чем за счет улучшения эффективности каждого каталитического акта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № FWES-2024-0018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J., *Bioluminescence, the nature of the light* (University of Georgia, 2020).
2. Немцева Е. В. и Кудряшева Н. С. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий. *Успехи химии*, **76** (1), 101–112 (2007).
3. Nakamura T. and Matsuda K. Studies on luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. I. Purification and physicochemical properties. *J. Biochem.*, **70** (1), 35–44 (1971). DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129624
4. Shimomura O., Johnson F. H., and Kohama Y. Reactions involved in bioluminescence systems of limpet (*Latia neritoides*) and luminous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69** (8), 2086–2089 (1972). DOI: 10.1073/pnas.69.8.2086
5. McCapra F. and Hysert D. W. Bacterial bioluminescence-identification of fatty acid as product, its quantum yield and a suggested mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52** (1), 298–304 (1973). DOI: 10.1016/0006-291X(73)90987-X
6. Sokolova I. V., Kalacheva G. S., and Tyulkova N. A. Analysis of the ratio of quantum yield and fatty acid formation of *Photobacterium leiognathi* bioluminescence. *Vest. MGU. Khimiya*, **41** (6), 118–120 (2000).
7. Kaku T., Sugiura K., Entani, T., Osabe K., and Nagai T. Enhanced brightness of bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer. *Sci. Rep.*, **11** (1), 14994 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-94551-4
8. Kanosue Y., Kojima S., and Ohkata K. Influence of solvent viscosity on the rate of hydrolysis of dipeptides by carboxypeptidase Y. *J. Phys. Org. Chem.*, **17** (5), 448–457 (2004). DOI: 10.1002/poc.752
9. Chen J., Kistemaker J. C., Robertus J., and Feringa B. L. Molecular stirrers in action. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (42), 14924–14932 (2014). DOI: 10.1021/ja507711h
10. Adam W., Diederling M., and Trofimov A. A. V. Intriguing double-inversion stereochemistry in the denitrogenation of 2, 3-diazabicyclo[2.2.1]heptene-type azoalkanes: a model mechanistic study in physical organic chemistry. *J. Phys. Org. Chem.*, **17** (8), 643–655 (2004). DOI: 10.1002/poc.834
11. Adam W., Diederling, M., and Trofimov, A. V. Solvent effects in the photodenitrogenation of the azoalkane diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene: viscosity-and polarity-controlled stereoselectivity in housane formation from the diazenyl diradical. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 1036–1039 (2002). DOI: 10.1039/B110562K
12. Лисица А. Е., Суковатый Л. А., Кратасюк В. А. и Немцева Е. В. Вязкие среды замедляют распад

- ключевого интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий. Докл. РАН. Науки о жизни, **492** (1), 320–324 (2020). DOI: 10.31857/S268673892002016X
13. Lisitsa A. E., Sukovaty L. A., Bartsev S. I., Deeva A. A., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (16), 8827 (2021). DOI: 10.3390/ijms22168827
 14. Lisitsa A. E., Sukovaty L. A., Deeva A. A., Gulnov D. V., Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. The Role of Cosolvent–Water Interactions in Effects of the Media on Functionality of Enzymes: A Case Study of Photobacterium leiognathi Luciferase. *Life*, **13** (6), 1384 (2023). DOI: 10.3390/life13061384
 15. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Taubert R., Gumienny R., and Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucl. Acids Res.*, **46** (1) 296–303 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky427
 16. Campbell Z. T., Baldwin T. O., and Miyashita O. Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics. *Biophys. J.*, **99**, 4012 (2010). DOI: 10.1016/j.bpj.2010.11.001
 17. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., and Berendsen H. J. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, **26** (16), 1701 (2005). DOI: 10.1002/jcc.20291
 18. Kim S., Lee J., Jo S., Brooks C. L. III, Lee H. S., and Im W. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J. Comput. Chem.*, **38** (21), 1879–1886, (2017). DOI: 10.1002/jcc.24829
 19. Michaud-Agrawal N., Denning E. J., Woolf T. B., and Beckstein O. MDAAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, **32** (10), 2319–2327 (2011). DOI: 10.1002/jcc.21787
 20. Gowers R. J., Linke M., Barnoud J., Reddy T. J. E., Melo M. N., Seyler S. L., Dotson D. L., Domanski J., Buchoux S., Kenney I. M., and Beckstein O. MDAAnalysis, *Proc. 15th Python Sci. Conf.*, **98**, 105 (2016).
 21. Суковатый Л. А., Лисица А. Е., Кратасюк В. А. и Немцева Е. В. Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты. *Биофизика*, **65** (6), 1135–1141 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060137
 22. Deeva A. A., Lisitsa A. E., Sukovaty L. A., Melnik T. N., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: Nothing is perfect. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (15), 8119 (2022). DOI: 10.3390/ijms23158119
 23. Deeva A. A., Temlyakova E. A., Sorokin A. A., Nemtseva E. V., and Kratasyuk V. A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, **32** (20), 3053–3057 (2016). DOI: 10.1093/bioinformatics/btw386
 24. Суковатый Л. А., Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз, Дис. ... канд. ф.-м. н. (Сибирский федеральный университет, 2023).
 25. Фонин А. В., Уверский В. Н., Кузнецова И. М. и Туроверов К. К. Фолдинг и стабильность белка в присутствии осмолитов. *Биофизика*, **61** (2), 222–230 (2016).
 26. Hastings J. W. and Gibson Q. H. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, **238** (7), 2537–2554 (1963). DOI: 10.1016/S0021-9258(19)68004-X
 27. Hastings J. W., Gibson Q. H., and Greenwood C. Evidence for high energy storage intermediates in bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol.*, **4** (6), 1227–1241 (1965). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1965.tb09309.x
 28. Lee J. Bacterial bioluminescence. Quantum yields and stoichiometry of the reactants reduced flavin mononucleotide, dodecanal, and oxygen, and of a product hydrogen peroxide. *Biochemistry*, **11** (18), 3350–3359 (1972). DOI: 10.1021/bi00768a007
 29. Nakamura A., Okumura J. I. and Muramatsu T. Quantitative analysis of luciferase activity of viral and hybrid promoters in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **49** (4), 368–373 (1998). DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199804)49:4<368::AID-MRD3>3.0.CO;2-L
 30. Hastings J. W., Balny C., Peuch C. L. and Douzou P. Spectral properties of an oxygenated luciferase–flavin intermediate isolated by low-temperature chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (12), 3468–3472 (1973). DOI: 10.1073/pnas.70.12.3468
 31. Tang Y. Q., Luo Y., Liu Y. J. Theoretical study on role of aliphatic aldehyde in bacterial bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol. A*, **419**, 113446 (2021). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2021.113446
 32. Tinikul R., Lawan N., Akeratchatapan N., Pimviriyakul P., Chinantuya W., Suadee C., Sucharitakul J., Chenprakhon P., Ballou D. P., and Entsch B. Protonation status and control mechanism of flavin–oxygen intermediates in the reaction of bacterial luciferase. *FEBS J.*, **288** (10), 3246–3260 (2021). DOI: 10.1111/febs.15653
 33. Luo Y. and Liu Y. J. Revisiting the origin of bacterial bioluminescence: QM/MM study on oxygenation reaction of reduced flavin in protein. *ChemPhysChem*, **20** (3), 405–409 (2019). DOI: 10.1002/cphc.201800970
 34. Lovell S. C., Word J. M., Richardson J. S., and Richardson D. C. The penultimate rotamer library. *Prot. Struct. Funct. Bioinf.*, **40** (3), 389–408 (2000). DOI: 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<389::AID-PROT50>3.0.CO;2-2

Effect of Viscous Media on the Quantum Yield of Bioluminescence in a Reaction Catalyzed by Bacterial Luciferase

A.E. Lisitsa*, L.A. Sukovaty*, V.A. Kratasyuk*. **, and E.V. Nemtseva*. **

*Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

Based on previously obtained data on the transient kinetics of the bioluminescent reaction catalyzed by *P. leiognathi* luciferase in media with polyols and sugars, the relative quantum yield of bioluminescence per substrate molecule was determined using mathematical modeling. It was found that in some media the relative quantum yield per aldehyde molecule increases compared to the value in the buffer: by 18% in the presence of glycerol and by 33% in the presence of sucrose. The conformation of the side chain of α His44, which is the functionally important and conservative in all bacterial luciferases, was analyzed using molecular dynamics methods. It has been established that in the presence of all cosolvents there is an increase in the probability of formation the optimal for catalysis orientation of this amino acid, which may contribute to the observed increase in the quantum yield of bioluminescence in viscous media.

Keywords: bacterial bioluminescence, quantum yield of bioluminescence, luciferase, effect of medium

УДК 577.1

УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ СЗ-РАСТЕНИЙ В АДАПТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

© 2024 г. Б.Н. Иванов*., Н.Н. Руденко*

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ivboni@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Представлены данные о том, что при изменении условий вегетации растений изменяются уровни экспрессии генов, кодирующих карбоангидразы хлоропластов, а также карбоангидразная активность компартментов хлоропласта. Результаты экспериментов с мутантами по генам хлоропластных карбоангидраз свидетельствуют, что активность карбоангидраз хлоропластов определяет характер изменений реакций фотосинтеза в ответ на изменения условий внешней среды. Предложены возможные механизмы участия карбоангидраз в протекании светозависимых процессов в хлоропласте. На основании полученных результатов высказана гипотеза о взаимосвязанном функционировании карбоангидраз в хлоропластах.

Ключевые слова: фотосинтез, высшие растения, адаптация, хлоропласты, карбоангидразы.

DOI: 10.31857/S0006302924030055, EDN: OFYQAS

Взаимопревращение форм неорганического углерода – углекислого газа (CO_2) и бикарбоната (HCO_3^-) – играет важную роль при осуществлении очень многих биологических процессов как в животных, так и в растениях. В растениях скорость этого взаимопревращения может ограничить фиксацию CO_2 и включение его молекул в органические соединения, т.е. ограничить продуктивный фотосинтез, являющийся основой не только питания и жизни растений, но и важнейшим биосферным процессом. Реакции превращения углекислого газа в бикарбонат и бикарбоната в углекислый газ в живых организмах катализируют ферменты карбоангидразы (карбонат гидролазы, ЕС 4.2.1.1). Карбоангидразы (КА) способны значительно ускорить протекание реакций гидратации CO_2 и дегидратации HCO_3^- :



Сокращения: КА – карбоангидраза, ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь, ФАР – фотосинтетически активная радиация, ФС1 – фотосистема 1, ФС2 – фотосистема 2, НФХТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, Рубиско – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа.

где $\text{CO}_2(\text{p})$ – растворенный углекислый газ. H_2CO_3 – угольная кислота, нестойкое соединение, легко распадающееся на CO_2 и воду, поэтому ее часто не включают в уравнения этих реакций; H_2CO_3 в водных растворах диссоциирует в соответствии с pK_1 , равным 6.35. КА значительно увеличивают константы скорости обеих реакций: k_{cat} может быть в тысячи раз выше, чем константа спонтанной, некатализируемой реакции, причем в большей степени увеличивается константа скорости реакции гидратации.

КА, обнаруженные к настоящему времени, ученые разделяют на восемь семейств, и считается, что они возникали в процессе эволюции живых организмов независимо друг от друга [1, 2]. Семейства обозначаются буквами греческого алфавита. КА девятого семейства, ϵ -КА, обнаруженные у цианобактерий, в настоящее время признаны сильно модифицированными β -КА [3]. В высших растениях найдены представители трех семейств, α , β , и γ [1]. КА присутствуют во всех клеточных организмах на Земле и могут иметь разную первичную, третичную и четвертичную структуру, различаться организацией активного центра, но подавляющее большинство этих фер-

ментов катализирует одну и ту же реакцию, используя сходные механизмы [4]. Исключением являются некоторые представители КА, так называемого ι -семейства, которые не содержат ионов металлов в активном центре и, как было предположено [5], депротонирование воды в активном центре опосредуют остатки аминокислот гидрофобного кармана активного центра. Кроме того, представители этого семейства, по-видимому, не катализируют реакцию обратимой дегидратации бикарбоната, так же как и представители β -КА бактериального типа [6] и некоторые θ -КА [7, 8].

В листьях высших растений КА функционируют на всем пути неорганического углерода из воздушной среды к центрам карбоксилирования, т.е. к местам, где молекулы CO_2 включаются в состав органических соединений. Они были обнаружены в плазмалемме, в цитоплазме, в оболочке и строме хлоропласта, а также в тилакоидах хлоропласта, в которых сосредоточены пигментный аппарат фотосинтеза и фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (ФЭТЦ). На всех этапах этого пути КА обеспечивают или перевод молекул CO_2 в молекулы HCO_3^- , диффундирующие в водной фазе, или молекул HCO_3^- в молекулы CO_2 . В обоих случаях преобразование осуществляется в ту форму неорганического углерода, которая необходима в данном месте в данное время. По мнению авторов статьи, одна из важных функций КА – обеспечивать быстрое взаимопревращение форм неорганического углерода бикарбонатного буфера для создания необходимой в том или ином компартменте реакции среды (рН) для обеспечения оптимальной скорости протекающих там биохимических реакций, а также в подаче или отводе протонов, участвующих в этих реакциях.

В хлоропластах, органеллах клетки, в которых осуществляется фотосинтез, обнаружены КА, принадлежащие двум семействам, α и β . Согласно литературным данным, в хлоропластах находятся четыре КА α -семейства: α -КА1, α -КА2, α -КА4, и α -КА5, три формы β -КА1: β -КА1.1, β -КА1.2 и β -КА1.3, а также β -КА5 [9, 10]. В работе будут, в основном, описаны результаты исследований, проведенных в лаборатории фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии РАН, которые были представлены на X Съезде Российского фотобиологического общества. Многолетние исследования лаборатории привели к обнаружению, в частности, КА в люмене тилакоидов высших растений, гороха, шпината и арабидопсиса [11, 12] и установлению расположения ряда КА в компартментах хлоропласта [13–15]. Ниже будут описаны результаты, свидетельствующие о том,

что КА хлоропластов могут быть участниками адаптационных перестроек фотосинтетических реакций при изменении условий вегетации растений, а также представлены гипотезы о роли КА в процессах, протекающих в тилакоидных мембранах.

РЕАКЦИИ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ

Участие КА хлоропластов в адаптационных изменениях фотосинтетических реакций могло, вероятно, отразиться в изменении их содержания при переносе растений в новые условия вегетации. Неоднозначные и противоречивые данные были получены в ходе многочисленных исследований по определению изменений КА-активности или интенсивности экспрессии генов $\beta\text{ка}1$, $\beta\text{ка}2$ и $\beta\text{ка}4$, в растениях различных видов, в зависимости от воздействия таких факторов, как засуха, засоление, холодостресс и других. Результаты этих исследований описаны в обзорах [16, 17].

Нами было проведено обширное исследование изменения интенсивности экспрессии генов КА в ответ на изменения освещенности растений в условиях различной длины светового дня [18]. Исследования проводили с растениями *Arabidopsis thaliana* вследствие возможности получения многочисленных мутантов этого растения по целевым генам, кодирующим белки интереса. Условия «длинного» дня, 16 ч день/8 ч ночь, близки к природным, а условия «короткого дня», 8 ч день/16 ч ночь, искусственно создаваемые в климатических камерах, обычно используются для изучения долговременной адаптации растений к тому или иному внешнему фактору, поскольку позволяют поддерживать арабидопсис в вегетативном состоянии в течение нескольких недель. Арабидопсис – тенелюбивое растение, и для него оптимальна интенсивность света около 70–150 мкмоль квантов ФАР $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (ФАР – фотосинтетически активная радиация) [19]; интенсивности света при выращивании, 80 мкмоль квантов ФАР $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 400 мкмоль квантов ФАР $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, обозначали как низкий свет и высокий свет соответственно.

В растениях и «короткого», и «длинного» дня увеличение освещенности приводит к интенсификации фотосинтеза листьев. При этом разная длительность протекания фотосинтеза в течение суток может предъявлять разные требования к организации фотосинтетического аппарата вследствие более длительного поступления световой энергии, более длительного функционирования систем синтеза и транспорта метаболитов в хлоропластах, большей продукции в них всех ак-

тивных форм кислорода, которые на свету именно в хлоропластах образуются с высокой скоростью. При переносе растений с низкого на высокий свет заметно изменялись морфологические и функциональные характеристики, соответствующие обнаруженным ранее акклимационным изменениям высших растений к повышенной освещённости [20, 21]. В течение 14 суток для растений «короткого» дня и 5 суток для растений «длинного» дня происходило заметное уменьшение содержания в листьях белков светособирающего комплекса фотосистемы II (ФСII) – Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 [18]. Эффективный квантовый выход ФСII становился ниже в растениях на высоком свете, чем в растениях на низком свете, а нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТ) возрастало. Эта характеристика флуоресценции хлорофилла отражает процесс, который защищает фотосинтетический аппарат от фотоингибирования, т.е. уменьшения эффективности его работы при поступлении квантов света в количестве большем, чем может быть использовано в ФЭТЦ. Было обнаружено [18], что разница в НФХТ на свету разной интенсивности обусловлена теми процессами, которые характеризует быстро релаксирующий компонент НФХТ, зависящий от протонирования белка PsbS [22]. Этот компонент обусловлен релаксацией так называемого энергозависимого тушения флуоресценции, зависящего от накопления протонов в люмене тилакоидов, и отражает диссипацию энергии света, прежде всего, в тепло. В наших экспериментах в растениях «короткого» дня увеличение освещённости приводило к более значительному относительному увеличению этого компонента, чем в растениях «длинного» дня, что указывает на различия во влиянии интенсивности света на развитие НФХТ при разной продолжительности дня.

В описанных экспериментах адаптация растений к повышенной интенсивности света приводила к изменению уровней экспрессии генов КА хлоропластов, причем эти изменения для ряда генов зависели от длины фотопериода при выращивании. В растениях «короткого» дня уровень экспрессии большинства генов КА хлоропластов через 2 недели адаптации к высокому свету был выше, чем на низком свете [18]. Сравнение уровней экспрессии генов стромальных КА выявляло различия между этими КА в адаптации к высокой освещённости только в условиях «длинного» дня. Уровень экспрессии гена тилакоидной КА, α -КА4, в условиях «короткого» дня после начального падения на высоком свете увеличивался и через 14 суток становился в 2 раза выше, чем на низком свете. В условиях «длинного» дня содержание транскриптов этого гена на высоком свете уже через 5 суток становилось в 16 раз выше, чем на низком свете. Такое поведение согласуется с

описанной ниже функцией этой КА в развитии энергозависимой части НФХТ, защищающей фотосинтетический аппарат от фотоингибирования, вероятность которого возрастает на высоком свете, о чем свидетельствует более высокий компонент НФХТ, характеризующий развитие фотоингибирования, на этом свете. Изменение уровня экспрессии гена другой тилакоидной КА, α -КА2, в условиях «короткого» дня походило на изменение уровня экспрессии гена α -КА4, но в случае α -КА2 возрастание уровня экспрессии ее гена на высоком свете было существенно больше. Однако в условиях «длинного» дня не происходило возрастание уровня экспрессии гена α -КА2 на высоком свете.

Содержание CO_2 в воздушной фазе также влияло на КА хлоропластов. Было обнаружено, что в зависимости от этого фактора среды изменялась КА-активность компартментов хлоропластов в листьях арабидопсиса [23]. КА-активности препаратов стромы и тилакоидов хлоропластов, а также уровни экспрессии генов, кодирующих α -КА1, α -КА2, β -КА1 и β -КА5 были измерены в листьях растений, акклиматизированных к различному содержанию CO_2 в воздухе: низкому (150 ppm), нормальному (450 ppm) и высокому (1200 ppm). Было обнаружено, что КА-активность стромы и тилакоидов, измеренная после двух недель акклиматизации, была тем выше, чем ниже концентрация CO_2 в воздухе. Этому предшествовало повышение уровней экспрессии генов, кодирующих хлоропластные (КА, β -КА5) и стромальные формы β -КА1 (β -КА1.1 и β -КА1.2) через одни-два суток после начала акклиматизации растений. Зависимость от содержания CO_2 в воздухе была наиболее заметна для КА-активности стромы – она была на два порядка выше в растениях, акклиматизированных к низкому содержанию CO_2 , чем в высокому. КА-активность тилакоидных мембран также была выше в растениях, акклиматизированных к низкому CO_2 , однако в этих растениях не наблюдали значительного повышения уровней экспрессии генов, кодирующих карбоангидразы α -КА2 и α -КА4, расположенные в тилакоидных мембранах.

Более значительные изменения уровней экспрессии генов КА хлоропластов были выявлены в более молодых растениях, возрастом 26 суток [23], чем в обычно исследуемых 50-60-суточных растениях. В молодых растениях уменьшенное содержание CO_2 в воздухе в течение двух недель приводило к небольшому возрастанию экспрессии гена КА α -КА1, возрастанию в 1.5–2.0 раза экспрессии генов КА α -КА2 и β -КА5, возрастанию в 9 раз экспрессии генов КА β -КА1.1 и β -КА1.2. Только уровень экспрессии гена, коди-

рующего α -КА4, уменьшался почти в 2 раза при адаптации к низкому содержанию CO_2 в воздухе.

Таким образом, изменение уровней экспрессии генов хлоропластных КА происходило различным образом при изменении условий вегетации, и это отражалось в изменении КА-активности компарментов хлоропласта. Эти результаты свидетельствуют о том, что активность КА в процессах, в которых они участвуют, зависит от условий окружающей среды.

ВЛИЯНИЕ ОТСУТСТВИЯ ХЛОРОПЛАСТНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ НА ИЗМЕНЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ

Изменения уровней экспрессии генов хлоропластных КА в зависимости от условий среды, однако, еще не свидетельствуют об их возможном участии в адаптационных механизмах растений, поскольку такого рода изменения происходят для многих ферментов при изменении условий окружающей среды. Чтобы обнаружить возможное участие хлоропластных КА в адаптационных механизмах, было проведено сравнение изменений при изменении условий выращивания характеристик фотосинтеза в растениях дикого типа и в растениях с нокаутом хлоропластных КА. Было обнаружено, что выключение синтеза отдельных КА, а именно, тилакоидной α -КА4, а также стромальных КА, α -КА1 и β -КА1, приводило к тому, что изменения характеристик растений, связанных с протеканием фотосинтеза, а именно, изменения в пигментном аппарате фотосинтеза и функционировании ФЭТЦ, различались в растениях дикого типа и мутантах при переходе к новым условиям.

Одним из важных маркеров окислительного стресса в растениях, состояния, возникновению которого в последние годы уделяется повышенное внимание, служит накопление в растениях пероксида водорода, H_2O_2 . Окислительный стресс часто возникает при увеличении освещенности растений. Его развитие, в значительной степени, связано с дисбалансом между повышенным образованием H_2O_2 при увеличении скорости восстановления кислорода в ФЭТЦ и возможностью дезактивации этой активной формы кислорода в строме хлоропласта. Мы нашли, что на низком свете ($50 \text{ мкмоль квантов ФАР м}^{-2}\text{с}^{-1}$) накопление H_2O_2 в листьях растений арабидопсиса дикого типа и мутантов с нокаутом генов стромальных КА, α -КА1 или β -КА1 было незначительно выше в мутантах по обеим КА. При высокой интенсивности света ($400 \text{ мкмоль квантов ФАР м}^{-2}\text{с}^{-1}$) его содержание в растениях дикого

типа не изменялось, но в мутантах становилось в три раза меньше (данные не опубликованы). Таким образом, увеличение интенсивности света по-разному повлияло на накопление H_2O_2 в растениях дикого типа и в мутантах по этим КА.

Подробно были изучены различия в изменениях в пигментном аппарате фотосинтеза и в функционировании ФЭТЦ в растениях дикого типа и нокаутного мутанта по тилакоидной α -КА4 при изменении освещенности [24, 25]. Оказалось, что НФХТ, которое было близким в растениях дикого типа и мутантах при низкой интенсивности света, при увеличении интенсивности света возрастало более значительно в растениях дикого типа, чем в растениях мутантов по α -КА4. Было установлено, что это происходило вследствие большего возрастания в растениях дикого типа, чем в мутантах, компонента НФХТ, связанного со степенью протонирования белка PsbS [24, 26], особенно в растениях, выращенных при высокой освещенности [24]. При этом в листьях мутантов по α -КА4 содержание белка PsbS на низком свете было выше на 20%, чем в растениях дикого типа, а на высоком свете становилось вдвое выше [25].

Параметр НФХТ, отражающий фотоингибирование, в растениях мутантов по α -КА4 был, напротив, выше, чем в растениях дикого типа [24], что сопровождалось уменьшением содержания корового белка ФСII, D1 [25], который, как известно, характеризуется высокими скоростями светозависимого синтеза и деградации [27]. Кроме того, в растениях, нокаутированных по α -КА4, при увеличении освещенности наблюдалось более значительное уменьшение содержания главных антенных белков, Lhcb1 и Lhcb2, чем в растениях дикого типа. Такое уменьшение общего количества белков Lhcb1 и Lhcb2 приводило и к снижению в этих мутантах содержания их фосфорилированных форм, образующихся вследствие активации киназы STN7, расположенной в тилакоидах. Именно фосфорилированные формы этих белков участвуют в перемещении части светособирающей антенны от ФСII к фотосистеме 1 (ФСI), т.е. участвуют в одной из фаз, так называемых изменений состояния (state transitions), еще одного механизма, приводящего к увеличению НФХТ [28, 29]. В мутантах по α -КА4, выращенных как на низком, так и на высоком свете, данная фаза была меньше, чем в растениях дикого типа [25], несмотря на существенное, двукратное увеличение содержания киназы STN7 в этих мутантах, по сравнению с диким типом.

Описанное снижение НФХТ компенсировалось также увеличением в мутантах по α -КА4, по сравнению с диким типом, параметра НФХТ, отражающего степень дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла; это отличие было наи-

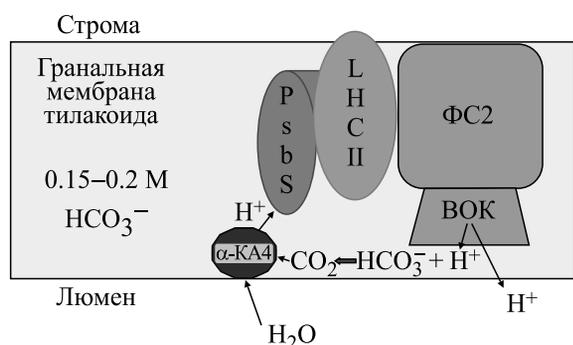


Рис. 1. Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы α -КА4 в тилакоидах. PsbS – белок, связанный с фотосистемой II, регулирующий величину нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, LHCII – антенный светособирающий комплекс фотосистемы II, ФС II – фотосистема II, ВОК – водоокисляющий комплекс.

более выраженным в условиях высокого света [24]. При этом в таких мутантах, выращенных на высоком свете, содержание соответствующих пигментов и степень их дезоксидации были на 20–30% больше, чем в растениях дикого типа в тех же условиях [25].

Таким образом, описанное влияние нокаута гена тилакоидной КА, α -КА4, и нокаутов генов стромальных КА на изменение характеристик фотосинтеза свидетельствует, что в присутствии этих хлоропластных КА пути адаптации к новым условиям функционируют в растениях иначе, чем в их отсутствие.

ФУНКЦИИ ТИЛАКОИДНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ

Очевидно, что влиять на приспособление тех или иных фотосинтетических реакций к протеканию в измененных условиях среды КА могут в том случае, если катализ реакций взаимопревращения CO_2 и бикарбоната существенен для протекания этих реакций. С использованием нокаутных мутантов по отдельным КА нами были выявлены характеристики фотосинтеза, которые зависят от наличия этих КА. Также исследования с этими мутантами позволили предположить, в каких процессах, важных для протекания фотосинтеза и защиты его аппарата, они участвуют.

α -КА4. Учитывая, что в мутантах, создаваемых с помощью T-ДНК инсерционного мутагенеза, возможно возникновение функциональных изменений, не связанных с нокаутом целевого гена, нами был создан нокаутный мутант по гену, кодирующему α -КА4, методом геномного редактирования CRISPR/Cas9 [30]. Исследование этого мутанта подтвердило обнаруженные в наших предыдущих работах с инсерционными мутанта-

ми изменения характеристик фотосинтетического аппарата растений арабидопсиса, вызываемые отсутствием этой КА. Помимо указанных выше изменений в НФХТ и квантовом выходе ФСII, было подтверждено, что в этих мутантах уровень синтеза крахмала в световой период, а также уровень деградации крахмала в темновой период значительно выше, чем в растениях дикого типа.

Также было подтверждено и различие в характере изменения экспрессии генов, кодирующих все белки светособирающих антенн ФСII. Особенно важно, что в мутантах, как полученных с использованием CRISPR/Cas9, так и в инсерционных, происходит значительно большее, чем в растениях дикого типа, увеличение экспрессии гена, кодирующего белок PsbS, что коррелирует с описанным выше увеличением содержания белка PsbS [25]. Этот белок, расположенный в контакте с антенной ФСII, в высших растениях играет ключевую роль в иницировании и развитии энергозависимого НФХТ [22]. Такое «замещающее» увеличение потенциальной продукции этого белка в отсутствие α -КА4, когда уменьшается энергозависимое НФХТ [24], указывает на наличие *in vivo* прямой связи функционирования α -КА4 с функцией белка PsbS. Можно предположить, что α -КА4 участвует в этом процессе как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации CO_2 в катализируемой ею реакции. Используя целый ряд экспериментальных подходов, мы показали, что α -КА4 расположена на люменальной стороне этих мембран вблизи ФСII [13]. С учетом такого расположения этой КА и наблюдаемых эффектов ее отсутствия нами предложена модель её функционирования в тилакоидах хлоропластов (рис. 1). При включении света протоны воды, освобождающиеся при ее окислении на донорной стороне ФСII, вступают в реакцию с бикарбонатом, связанным с тилакоидной мембраной (где его концентрация в расчете на объем мембраны составляет 0.15–0.20 М [31]), что приводит к резкому увеличению концентрации CO_2 . Такое увеличение стимулирует гидратазную реакцию с участием карбоангидразы α -КА4, и протоны, получающиеся в результате этой реакции, поступают от КА к белку PsbS, претерпевающему в результате этого конформационные изменения [22], передающиеся светособирающей антенне, в которой усиливается диссипация энергии в тепло, что отражается в увеличении НФХТ. Поскольку НФХТ развивается в светособирающей антенне, становится понятным, почему в мутанте происходят изменения в экспрессии генов и содержании белков светособирающей антенны (см. выше).

При сравнении растений дикого типа и мутантов по α -КА4 был также исследован важный ас-

пект проблемы приспособления растений к новым условиям среды, а именно, влияние отсутствия этой КА на гормональный статус растений. Молекулы гормонов растений, абсцизовой, жасмоновой и салициловой кислот, активируют каскады реакций, приводящих, в том числе, к изменению интенсивности транскрипции так называемых «маркерных» генов, участвующих в передаче сигналов о стрессе и в развитии приобретаемой системной резистентности к новым условиям [32]. Нокаут α -КА4 повлиял не только на уровень экспрессии генов, кодирующих все белки светособирающей антенны ФСII, но и генов белков, активируемых иммунными сигналами растений: генов, индуцируемых салициловой кислотой (*At1g64280 (npr1)* и *At1g74710 (ics1)*), и генов, индуцируемых жасмоновой кислотой (*At1g17420 (lox3)* и *At5g42650 (aos)*) [30]. Возможно, сигналом к указанному изменению интенсивности экспрессии генов, кодирующих белки ФСII, являются именно изменения уровня молекул, участвующих во внутриклеточной и межклеточной передаче сигналов. Оказалось, что в обычных условиях вегетации арабидопсиса, т.е. при коротком дне и невысокой освещенности, уровни экспрессии генов, зависящие от содержания салициловой кислоты, были ниже в мутантах, тогда как уровень экспрессии генов, зависящих от содержания жасмоновой кислоты, был выше в этих мутантах, чем в растениях дикого типа [30]. Похоже, что в мутантах путь системной приобретенной резистентности, индуцируемый жасмоновой кислотой, активируется, в то время как путь, индуцируемый салициловой кислотой, который является антагонистом первого, подавляется. Обнаруженное влияние отсутствия α -КА4 на гормональный статус растений, очевидно, должно заметно сказываться в различиях, возникающих при адаптации таких мутантов и растений дикого типа к новым условиям среды.

α -КА2. Исследование мутантных растений арабидопсиса, в которых была подавлена экспрессия гена, кодирующего α -КА2 [15, 26], показало, что эффективные квантовые выходы как ФСII, так и ФСI были в них выше, а степень восстановления пула пластохинона ниже, чем в растениях дикого типа, при том что содержание реакционных центров обеих фотосистем было одинаковым. Измерения электрохромного сдвига поглощения каротиноидов показали, что светозависимый градиент pH через тилакоидную мембрану (ΔpH) был ниже в листьях растений мутантов. Содержание крахмала в листьях, как интегральный показатель фотосинтеза, в мутантах было ниже, чем в растениях дикого типа.

Величина НФХТ в мутантах была ниже, чем в растениях дикого типа в начале освещения, но становилась слегка выше при достижении стационарного состояния [15]. Указанные выше свой-

ства нокаутного мутанта по α -КА2, в частности, более низкая величина ΔpH и более высокий квантовый выход ФСII, чем в растениях дикого типа, и изменения НФХТ в зависимости от времени освещения оказались очень похожи на свойства растений арабидопсиса с увеличенной продукцией мутированного трансмембранного K^+/H^+ антипортера, KEA3, имеющего точечную мутацию в трансмембранном домене, DPGRoх, которая приводила к увеличенной протонной проводимости тилакоидной мембраны в данном мутанте [33]. На основании выявленных в мутанте по α -КА2 изменений процессов, протекающих в ФЭТЦ и тилакоидной мембране, и с учетом указанного сходства свойств этого мутанта со свойствами мутанта DPGRoх было высказано предположение о [15] структурно-функциональной связи α -КА2 с каналом, регулирующим утечку протонов через тилакоидную мембрану. Предположение о связи КА с ионным каналом не необычно, так как показано, что в животных тканях КА участвуют в передаче протонов и/или бикарбоната ион-транспортным системам в клеточных мембранах [34]. Для объяснения полученных результатов важно то, что бикарбонат, субстрат КА, является преобладающей формой неорганического углерода в строме на свету. При освещении растений величина pH в строме повышается от 7.0 до 7.7–8.0, и при величине pH 8.0 в равновесии с воздухом, содержащим 400 ppm (0.04%) CO_2 , концентрация этого газа в водной фазе равна 15.5 мкМ, а концентрация HCO_3^- – примерно 700 мкМ. В случае тесной ассоциации α -КА2 с ионным каналом эта КА, катализирующая дегидратацию бикарбоната в реакции с протонами, может использовать протоны, поступающие из люмена через ионный канал, действуя как своего рода регулирующийся клапан, причем предварительные результаты предполагают, что α -КА2 расположена на стромальной стороне тилакоидных мембран (рис. 2). В отсутствие α -КА2 нормальное функционирование ионного канала нарушено, и поток протонов становится неконтролируемым, и, судя по полученным данным, возрастает. Именно более низкая величина ΔpH объясняет и большие величины квантовых выходов фотосистем, и более низкую степень восстановления пула пластохинона.

Таким образом, функционирование α -КА2 непосредственно связано с биоэнергетикой хлоропластов, в которых энерготрансформирующими (сопрягающими) мембранами служат мембраны тилакоидов. Можно указать еще на одно следствие из предложенной модели функционирования α -КА2, а именно, увеличение в ее присутствии скорости трансформации бикарбоната в CO_2 в строме вследствие того, что скорость реакции дегидратации бикарбоната с участием КА на

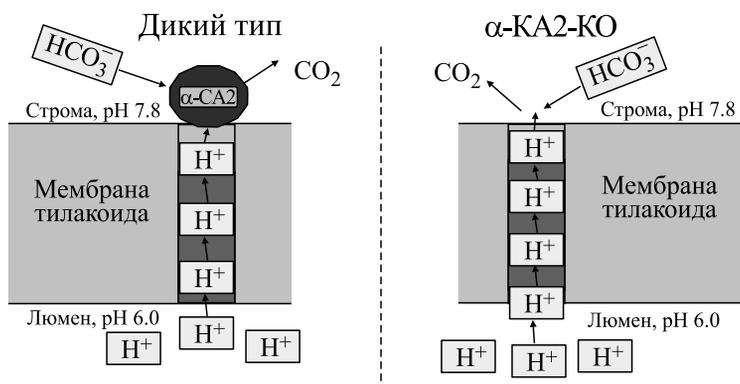


Рис. 2. Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы α -KA2 в тилакоидах. ДТ – дикий тип, α -KA2-KO – мутант с нокаутированным геном карбоангидразы α -KA2.

много порядков выше скорости спонтанной реакции, которая может происходить при выходе протонов из люмена в строму, не контролируемом КА. CO_2 служит субстратом рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксылазы/оксигеназы (Рубиско), ключевого фермента фотосинтеза, расположенного в строме хлоропласта и катализирующего соединение молекул CO_2 с молекулой рибулозобисфосфата, т.е. реакцию включения неорганического углерода в органическое соединение. Нами было найдено, что в мутантах по α -KA2 скорость фиксации CO_2 ниже, чем в растениях дикого типа (данные не опубликованы).

α -KA5. Роль α -KA5 в хлоропластах выявлялась постепенно. Сначала нами была обнаружена КА-активность в стромальных тилакоидных мембранах, выделенных как из листьев гороха [35], так и из листьев арабидопсиса [36]. Свойства этой активности отличались от свойств КА-активности гранальных тилакоидных мембран. Позднее мы установили, что известный еще с начала 60-х годов прошлого века эффект увеличения скорости фотофосфорилирования при добавке бикарбоната в суспензию изолированных тилакоидов, который наблюдали в тилакоидах шпината [37], овса [38] и гороха [39], зависит от функциональной активности некой КА [39]. При этом добавки анионов других слабых кислот (ацетата, фумарата или сульфита) не стимулировали фотофосфорилирование. Было показано, что мафенид, водорастворимый ингибитор карбоангидраз, подавлял стимуляцию при добавке бикарбоната; в отсутствие бикарбоната мафенид практически не влиял на скорость фотофосфорилирования. Было обнаружено также заметное подавление сопряженного электронного транспорта в условиях, когда бикарбонат стимулировал фотофосфорилирование. Мафенид заметно ингибировал КА-активность тилакоидов, хотя и не полностью, что могло свидетельствовать о том, что не все КА, находящиеся в тилакоидах, ответственны за эту стимуляцию.

В тилакоидах, изолированных из листьев арабидопсиса дикого типа, так же как и в тилакоидах гороха, наблюдали увеличение скорости фотофосфорилирования при введении бикарбоната в суспензию [14]. Мафенид также не подавлял фотофосфорилирование в отсутствие бикарбоната, но полностью ликвидировал стимуляцию бикарбонатом. Бикарбонат не влиял на скорости базального и разобщенного транспортов электронов в опытах с метилвиологеном как акцептором электронов, но, как и в опытах с тилакоидами гороха, частично подавлял электронный транспорт в присутствии АДФ и неорганического фосфата, т.е. в условиях фосфорилирования. Поскольку стимуляция фотофосфорилирования, как правило, сопровождается увеличением скорости электронного транспорта, последние эффекты указывали на дополнительный процесс стимуляции фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната, не связанный с электронным транспортом по ФЭТЦ.

В отличие от стимуляции при добавке бикарбоната к тилакоидам растений дикого типа, такая добавка не изменяла скорость фотофосфорилирования в тилакоидах, изолированных из листьев мутантов, в которых с помощью нокаутной мутации был заблокирован синтез α -KA5, т.е. присутствие этой карбоангидразы было необходимо для осуществления указанной стимуляции [14].

С использованием масс-спектрометрического анализа, нами было установлено [14], что α -KA5 расположена в стромальных тилакоидных мембранах. Отметим, что практически все комплексы АТФ-синтазы в тилакоидах сосредоточены в стромальных мембранах. Учитывая свойства мафенида, прежде всего его гидрофильность, можно было заключить, что КА, ответственная за ускорение фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната, вероятнее всего, расположена в тилакоидной мембране на ее стромальной поверхности, которая в выделенных тилакоидах

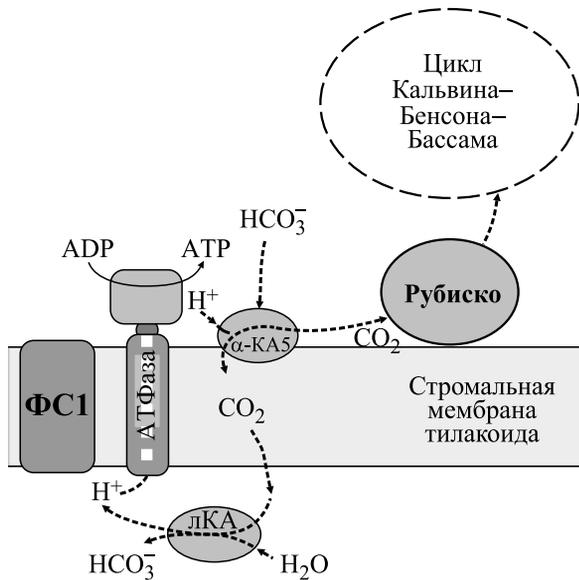


Рис. 3. Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы α -КА5 в тилакоидах. ФС I – фотосистема I, лКА – люменальная карбоангидраза.

обращена в среду [39]. Наличие так расположенной КА в тилакоидах следовало также из того, что КА-активность стромальных тилакоидов сходным образом ингибировалась хорошо проникающим в мембрану ингибитором КА этоксизоламидом и плохо проникающим в мембрану ацетазоламидом [35].

Чтобы объяснить роль КА в стимуляции фотофосфорилирования при введении бикарбоната в суспензию тилакоидов, мы предполагаем, что ускорение фотофосфорилирования может быть следствием возрастания скорости преобразования бикарбоната в CO_2 в реакции дегидратации, катализируемой мембраносвязанной α -КА5. Основной барьер для CO_2 молекул при пересечении липидных мембран – это неперемешиваемые примембранные слои, тогда как сами мембраны легко проницаемы [40]. Поэтому часть молекул CO_2 , появившихся в приповерхностных слоях тилакоидной мембраны вследствие активности α -КА5, может легко диффундировать в тилакоидный люмен. В люмене эти молекулы могут гидратироваться с участием люменальной КА с освобождением протона. Увеличение концентрации протонов в люмене в результате этого процесса может привести к увеличению ΔpH и увеличению продукции АТФ (рис. 3). Стимулирование скорости синтеза АТФ при увеличении ΔpH хорошо известно [41, 42].

Гидратация CO_2 в люмене должна полнее происходить в фосфорилирующих условиях, поскольку концентрация протонов там уменьшена вследствие их выхода в среду через АТФ-синтазу –

pH в люмене в этих условиях возрастает по сравнению с базальными условиями почти на 1 ед. [43], что соответствует уменьшению концентрации протонов в 10 раз. Таким образом, увеличение концентрации протонов при диффузии молекул CO_2 в люмен обеспечивает и ускорение фотофосфорилирования, и именно в фосфорилирующих условиях становится причиной уменьшения скорости электронного транспорта, вследствие возрастания фотосинтетического контроля. В базальных условиях, когда pH люмена существенно ниже, чем в условиях фотофосфорилирования, поток CO_2 и его гидратация затруднены, и скорость электронного транспорта не меняется при добавке бикарбоната к тилакоидам.

Важное следствие описанной ситуации – то, что, возможно, значительная часть молекул CO_2 , образовавшихся при дегидратации бикарбоната на поверхности мембраны, направляются в строму хлоропластов, где они могут стать субстратом Рубиско, обеспечивая увеличение скорости образования органических соединений. Учитывая значительное увеличение содержания бикарбоната в строме на свету, нельзя исключить участие α -КА5 в подаче CO_2 Рубиско *in vivo*.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КАРБОАНГИДРАЗ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ КООПЕРАТИВНО

В ходе исследования функций КА хлоропластов возникло представление, что КА этих органелл, и, вероятно, всей клетки, функционируют взаимосвязанно, действуя в кооперации. В некоторых случаях это прослеживается в явном виде, как в случае функционирования α -КА2, α -КА4 и α -КА5. Согласно полученным экспериментальным результатам, эти КА расположены в тилакоидной мембране и, в соответствии с моделями, описывающими их функционирование (см. выше), регулируют такой ключевой параметр биоэнергетики хлоропласта, как концентрацию протонов в люмене тилакоидов. Величина этой концентрации, pH люмена, в свою очередь, определяет как возможность защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования путем регулирования степени протонирования белка PsbS и активности виолаксантиндеэпоксидазы, так и скорость продукции молекул АТФ, необходимых для функционирования цикла Кальвина, обеспечивающего фиксацию CO_2 . При этом первая функция, возможно, даже важнее, чем вторая.

Взаимосвязь между КА хлоропласта можно проиллюстрировать взаимозависимостью уровней экспрессии генов, кодирующих эти КА. Мы показали, что нокаут гена, кодирующего α -КА2, оказывает значительное влияние на уровни экспрессии генов тилакоидных КА, α -КА4 и α -КА5,

а также генов стромальных КА, α -КА1 и β -КА1 [15]. При этом, что может быть важно для понимания до сих пор неясных функций двух последних, уровень экспрессии гена, кодирующего α -КА1, возрастал в два раза, а гена, кодирующего β -КА1, уменьшался тоже в два раза. Уровень экспрессии гена, кодирующего α -КА2, возрастал в 3.5 раза, а гена, кодирующего α -КА5, уменьшался почти в три раза.

Интересно, что, в свою очередь, при нокауте гена, кодирующего α -КА4, уровень экспрессии гена, кодирующего α -КА2, возрастал почти в восемь раз, а уровень экспрессии генов стромальных КА не изменялся [30]. Различие во влиянии нокаута генов, кодирующих α -КА2 и α -КА4, состояло также в том, что, если нокаут гена первой не влиял на уровень экспрессии генов цитоплазматических КА, нокаут гена, кодирующего α -КА4, приводил к возрастанию этих уровней.

Выключение синтеза α -КА5 в растениях, выращенных при атмосферной концентрации углекислого газа, не приводит к возрастанию уровня экспрессии гена самой обильной стромальной КА, β -КА1, но увеличивает экспрессию генов стромальных α -КА1 и β -КА5 [44]. Возрастает также уровни экспрессии генов тилакоидных КА, α -КА2 и α -КА4, что сопровождается увеличением КА-активности тилакоидов.

Литературные данные также свидетельствуют в пользу того, что КА функционируют совместно. В высших растениях выключение синтеза большинства КА не приводит к существенному подавлению роста растений и не оказывает существенного влияния на параметры фотосинтеза [45–47]. Более глубокие физиологические эффекты наблюдаются при одновременном выключении синтеза двух и более КА. Авторы работы [48] в 2010 г. с использованием двойных мутантов с выключенным синтезом плазмалеммой β -КА4.1 и стромальной β -КА1 показали, что оба эти фермента участвуют в регуляции устьичной проводимости листьев для углекислого газа. Существенное подавление роста мутантов с нокаутными генами двух цитоплазматических КА, β -КА4.2 и β -КА2 при выращивании растений в условиях низкого содержания углекислого газа в воздухе [49]. Единичные мутации по указанным КА не приводили к такому эффекту. Авторы предположили, что обе эти цитоплазматические β -КА необходимы для преобразования форм неорганического углерода в клетках листа для удовлетворения потребности растений в углероде. В растениях табака мутации в генах β -КА1 и β -КА5 не приводили к каким-либо изменениям, по сравнению с растениями дикого типа [50]. Только одновременный нокаут обоих генов β -КА1 и β -КА5 приводил к снижению скорости прораста-

ния семян, уменьшению их массы и задержке роста мутантных растений.

Кооперативное функционирование КА наблюдалось и в митохондриях арабидопсиса, где КА формируют домен, состоящий из трёх γ -КА и двух γ -КА-подобных белков в составе NADH дегидрогеназного комплекса I [51]. Мутации в, по крайней мере, двух из пяти генов этого домена, приводили к разрушению этих комплексов [52]. Такие мутанты, выращенные при атмосферной концентрации углекислого газа в воздухе, демонстрировали задержку роста, по сравнению с растениями дикого типа, что компенсировалось выращиванием мутантных растений при высоком содержании CO₂ и указывало, по мнению авторов, на участие митохондриального домена КА в поддержании эффективного функционирования фотосинтеза.

Описанные результаты позволяют предположить, что КА являются звеньями кооперативных цепочек, хотя, очевидно, не заменяют друг друга. Выпадение из такой цепочки какой-либо КА приводит к нарушению конкретного процесса, в котором она участвует, и изменение экспрессии генов других КА, только частично может компенсировать нарушение этого процесса, что было видно по изменению адаптационных возможностей растения. Таким образом, функционирование каждой КА важно для растения в целом, и каждая жизненно необходима растению, хотя катализирует элементарную реакцию взаимопревращения двух неорганических соединений, которая повсеместно происходит и в неживой природе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетние исследования КА высших С3-растений, проводимые различными исследовательскими группами по всему миру, пока не позволяют определенно ответить на вопрос о физиологической роли этих ферментов. Результаты экспериментальных исследований, описанные в статье, свидетельствуют о том, что КА хлоропластов реагируют на изменение условий вегетации растений, а именно, изменяются уровни экспрессии их генов и изменяются КА-активности компартментов хлоропласта. При этом в нокаутных мутантах в отсутствие стромальных КА, α -КА1 или β -КА1, и в отсутствие каждой из тилакоидных КА, α -КА4, α -КА2 и α -КА5 происходят изменения в реакциях, связанных с процессом фотосинтеза. В растениях, в которых были нокаутированы гены, кодирующие КА α -КА1, или β -КА1, или α -КА4, при перемещении в новые условия вегетации возникают существенные отличия в протекании таких реакций в растениях дикого типа, перемещенных в эти же условия. На основа-

нии различий между растениями дикого типа и мутантами по тилакоидным КА в характеристиках функциональной активности ФЭТЦ и в биоэнергетических реакциях, протекающих в тилакоидных мембранах, предложены гипотезы функционирования этих КА. Обнаружено, что нокаут гена одной из КА хлоропласта приводил к изменению экспрессии генов других хлоропластных КА, что может указывать на кооперативный характер функционирования КА в этой органелле.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная научная программа, тема № 122041100186-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hewett-Emmett D. and Tashian R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5** (1), 50–77 (1996). DOI: 10.1006/mpev.1996.0006
- DiMario R. J., Machingura M. C., Waldrop G. L., and Moroney J. V. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. *Plant Sci.*, **268**, 11–17 (2018). DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.12.002
- Sawaya M. R., Cannon G. C., Heinhorst S., Tanaka Sh., Williams E. B., Yeates T. O., and Kerfeld Ch. A. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J. Biol. Chem.*, **281** (11), 7546–7555 (2006). DOI: org/10.1074/jbc.M510464200
- Supuran C. T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.*, **473** (14), 2023–2032 (2016). DOI: 10.1042/BCJ20160115
- Hirakawa Y., Senda M., Fukuda K., Yu H. Y., Ishida M., Taira M., Kinbara K., and Senda T. Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biol.*, **19** (1), 105 (2021). DOI: org/10.1186/s12915-021-01039-8
- Rowlett R. S. Structure and catalytic mechanism of β -carbonic anhydrases. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, Ed. by S. Frost and R. McKenna (Series “Subcellular Biochemistry”, vol. 75) (Springer, Dordrecht, 2014), pp. 53–76. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_4
- Kasili R. W., Rai A. K., and Moroney J. V. LCIB functions as a carbonic anhydrase: evidence from yeast and *Arabidopsis* carbonic anhydrase knockout mutants. *Photosynth. Res.*, **156** (2), 193–204 (2023). DOI: 10.1007/s11120-023-01005-1
- Kikutani S., Nakajima K., Nagasato C., Tsuji Y., Miyatake A., and Matsuda Y. Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113** (35), 9828–9833 (2016). DOI: 10.1073/pnas.1603112113
- Руденко Н. Н. и Иванов Б. Н. Нерешенные проблемы функционирования карбоангидраз в фотосинтезирующих клетках высших C_3 растений. *Биохимия*, **86** (10), 1464–1478 (2021). DOI: 10.1134/S0006297921100072
- Shen J., Li Z., Fu Y., and Liang J. Identification and molecular characterization of the alternative spliced variants of beta carbonic anhydrase 1 (β CA1) from *Arabidopsis thaliana*. *Peer J.*, **9**, e12673 (2021). DOI: 10.7717/peerj.12673
- Fedorchuk T., Rudenko N., Ignatova L., and Ivanov B. The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from *Arabidopsis* leaves. *J. Plant Physiol.*, **171** (11), 903–906 (2014). DOI: 10.1016/j.jplph.2014.02.009
- Rudenko N. N., Ignatova L. K., and Ivanov B. N. Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynth. Res.*, **91** (1), 81–89 (2007). DOI: 10.1007/s11120-007-9148-2
- Ignatova L., Zhurikova E., and Ivanov B. The presence of the low molecular mass carbonic anhydrase in photosystem II of C_3 higher plants. *J. Plant Physiol.*, **232**, 94–99 (2019). DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.017
- Fedorchuk T. P., Kireeva I. A., Opanasenko V. K., Terentyev V. V., Rudenko N. N., Borisova-Mubarakshina M. M., and Ivanov B. N. Alpha carbonic anhydrase 5 mediates stimulation of ATP synthesis by bicarbonate in isolated *arabidopsis* thylakoids. *Front. Plant Sci.*, **12**, 662082 (2021). DOI: 10.3389/fpls.2021.662082
- Nadeeva E. M., Ignatova L. K., Rudenko N. N., Vetoshkina D. V., Naydov I. A., Kozuleva M. A., and Ivanov B. N. Features of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* plants with knocked out gene of alpha carbonic anhydrase 2. *Plants*, **12** (9), 1763 (2023). DOI: org/10.3390/plants12091763
- Rudenko N. N., Borisova-Mubarakshina M. M., Ignatova L. K., Fedorchuk T. P., Nadeeva-Zhurikova E. M., and Ivanov B. N. Role of plant carbonic anhydrases under stress conditions. In *Plant Stress Physiol.*, Ed. by A. Hossain (InTech, London), pp. 301–325. DOI: 10.5772/intechopen.91971
- Polishchuk O. V. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases. *Planta*, **253** (2), 58 (2021). DOI: 10.1007/s00425-020-03553-5
- Руденко Н. Н., Ветошкина Д. В., Федорчук Т. П. и Иванов Б. Н. Влияние освещенности растений при разном фотопериоде на уровень экспрессии генов

- карбоангидраз α -и β -семейств в листьях *Arabidopsis thaliana*. *Биохимия*, **82** (9), 1318–1329 (2017). DOI: 10.1134/S000629791709005X
19. Weigel D. and Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (CSHL Press, NY, 2002).
 20. Demmig-Adams B. and Adams W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 599–626 (1992). DOI: 18.1146/annurev.pp.43.060192.003123
 21. Bailey S., Walters R. G., Jansson S., and Horton P. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta*, **213** (5), 794–801 (2001). DOI: 10.1007/s004250100556
 22. Ruban A. V. Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants against photodamage. *Plant Physiol.*, **170**, 1903–1916 (2016).
 23. Rudenko N. N., Ignatova L. K., Naydov I. A., Novichkova N. S., and Ivanov B. N. Effect of CO₂ content in air on the activity of carbonic anhydrases in cytoplasm, chloroplasts, and mitochondria and the expression level of carbonic anhydrase genes of the α - and β -families in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plants*, **11** (16), 2113 (2022). DOI: org/10.3390/plants11162113
 24. Rudenko N. N., Fedorchuk T. P., Vetoshkina D. V., Zhurikova E. M., Ignatova L. K., and Ivanov B. N. Influence of knockout of *At4g20990* gene encoding α -CA4 on photosystem II light-harvesting antenna in plants grown under different light intensities and day lengths. *Protoplasma*, **255**, 69–78 (2018). DOI: 10.1007/s00709-017-1133-9
 25. Rudenko N. N., Fedorchuk T. P., Terentyev V. V., Dyмова O. V., Naydov I. A., Golovko T. K., Borisova-Mubarakshina M. M., and Ivanov B. N. The role of carbonic anhydrase α -CA4 in the adaptive reactions of photosynthetic apparatus: the study with α -CA4 knockout plants. *Protoplasma*, **257**, 489–499 (2020). DOI: 10.1007/s00709-019-01456-1
 26. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Ветошкина Д. В. и Иванов Б. Н. Участие двух карбоангидраз альфа семейства в фотосинтетических реакциях *Arabidopsis thaliana*. *Биохимия*, **81**, 1463–1470 (2016).
 27. Sundby C., McCaffery S., and Anderson J. M. Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J. Biol. Chem.*, **268** (34), 25476–25482 (1993).
 28. Rochaix J.-D., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., and Goldschmidt-Clermont M. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **367** (1608), 3466–3474 (2012). DOI: 10.1098/rstb.2012.0064
 29. Allen J. F. State transitions – a question of balance. *Science*, **299** (5612), 1530–1532 (2003). DOI: 10.1126/science.1082833
 30. Rudenko N. N., Permyakova N. V., Ignatova L. K., Nadeeva E. M., Zagorskaya A. A., Deineko E. V., and Ivanov B. N. The role of carbonic anhydrase α CA4 in photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana* studied, using the Cas9 and T-DNA induced mutations in its gene. *Plants*, **11** (23), 3303 (2022). DOI: org/10.3390/plants11233303
 31. Stemler A. J. The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase. *Physiol. Plant.*, **99** (2), 348–353 (1997). DOI: 10.1034/j.1399-3054.1997.990220.x
 32. Pieterse C. M. J., Van Der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., and Van Wees S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 489–521 (2012). DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
 33. Wang C. and Shikanai T. Modification of activity of the thylakoid H⁺/K⁺ antiporter KEA3 disturbs Δ pH-dependent regulation of photosynthesis. *Plant Physiol.*, **181** (2), 762–773 (2019). DOI: 10.1104/pp.19.00766
 34. Sterling D., Alvarez B. V., and Casey J. R. The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger binds carbonic anhydrase IV. *J. Biol. Chem.*, **277** (28), 25239–46 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M202562200
 35. Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Христин М. С. и Иванов Б. Н. Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран. *Биохимия*, **71** (5), 651–659 (2006).
 36. Ignatova L. K., Rudenko N. N., Mudrik V. A., Fedorchuk T. P., and Ivanov B. N. Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSI. *Photosynth. Res.*, **110**, 89–98 (2011). DOI: 10.1007/s11120-011-9699-0
 37. Punnett T. and Iyer R. V. The enhancement of photophosphorylation and the hill reaction by carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2335–2339 (1964).
 38. Cohen W. S. and Jagendorf A. T. Inhibition of energy-linked reactions in chloroplasts by polygalacturonate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **150** (1), 235–243 (1972). DOI: 10.1016/0003-9861(72)90031-8
 39. Федорчук Т. П., Опанасенко В. К., Руденко Н. Н. и Иванов Б. Н. Исследование стимуляции фотофосфорилирования бикарбонатом в изолированных тилакоидах: эффекты ингибиторов карбоангидраз. *Биол. мембраны*, **35** (1), 34–41 (2018).
 40. Missner A., Kügler P., Saparov S. M., Sommer K., Mathai J. C., Zeidel M. L., and Pohl P. Carbon dioxide transport through membranes. *J. Biol. Chem.*, **283** (37), 25340–25347 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M800096200
 41. Schuldiner S., Rottenberg H., and Avron M. Membrane potential as a driving force for ATP synthesis in chloroplasts. *FEBS Lett.*, **28** (2), 173–176 (1972). DOI: 10.1016/0014-5793(72)80704-X
 42. Pick U., Rottenberg H., and Avron M. The dependence of photophosphorylation in chloroplasts on delta pH and external pH. *FEBS Lett.*, **48** (1), 32–36 (1974). DOI: 10.1016/0014-5793(74)81055-0
 43. Tikhonov A. N. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **116** (2–3), 511–534 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9845-y
 44. Руденко Н., Игнатова Л., Федорчук Т., Надеева Е., Козулёва М., Вильянен Д. и Иванов Б. Участие хлоропластных карбоангидраз в регуляции функциональной активности фотосинтетического ап-

- парата. В сб. *От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики* (Пушино, 2022), с. 48.
45. Price G. D., von Caemmerer S., Evans J. R., Yu J.-W., Lloyd J., Oja V., Kell P., Harrison K., Gallagher A., and Badger M. R. Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta*, **193**, 331–340 (1994). DOI: org/10.1007/BF00201810.
 46. Weerasooriya H. N., DiMario R. J., Rosati V. C., Rai A. K., LaPlace L. M., Filloon V. D., Longstreth D. J., and Moroney J. V. Arabidopsis plastid carbonic anhydrase β CA5 is important for normal plant growth. *Plant Physiol.*, **190** (4), 2173–2186 (2022). DOI:10.1093/plphys/kiac451
 47. Sharma N., Froehlich J. E., Rillema R., Raba D. A., Chambers T., Kerfeld C. A., Kramer D. M., Walker B., and Brandizzi F. Arabidopsis stromal carbonic anhydrases exhibit non-overlapping roles in photosynthetic efficiency and development. *Plant J.*, **15** (2), 386–397 (2023). DOI:10.1111/tpj.16231
 48. Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordström M., Böhmer M., Xue S., Ries A., Godoski A. J., Kuhn J. M., and Schroeder J. I. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat. Cell Biol.*, **12** (1), 87–93 (2010). DOI:10.1038/ncb2009
 49. DiMario R. J., Quebedeaux J. C., Longstreth D. J., Dassanayake M., Hartman M. M., and Moroney J. V. The cytoplasmic carbonic anhydrases β CA2 and β CA4 are required for optimal plant growth at low CO₂. *Plant Physiol.*, **171** (1), 280–293 (2016). DOI: 10.1104/pp.15.01990
 50. Hines K. M., Chaudhari V., Edgeworth K. N., Owens T. G., and Hanson M. R. Absence of carbonic anhydrase in chloroplasts affects C3 plant development but not photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118** (33), e2107425118 (2021). DOI: 10.1073/pnas.2107425118
 51. Perales M., Parisi G., Fornasari M. S., Colaneri A., Villarreal F., Gonzalez-Schain N., Echave J., Gomez-Casati D., Braun H. P., Araya A., and Zabaleta E. Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I. *Plant Mol. Biol.*, **56** (6), 947–957 (2004). DOI: 10.1007/s11103-004-6324-z
 52. Soto D., Córdoba J. P., Villarreal F., Bartoli C., Schmitz J., Maurino V. G., Braun H. P., Pagnussat G. C., and Zabaleta E. Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **83** (5), 831–844 (2015). DOI: 10.1111/tpj.12930

The Involvement of Carbonic Anhydrases in Chloroplasts of C3 Higher Plants in Adaptation Changes of Photosynthetic Reactions

B.N. Ivanov* and N.N. Rudenko*

**Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The present research shows that changes in vegetation conditions have implications both for the expression levels of genes encoding chloroplast carbonic anhydrases and the carbonic anhydrase activity of chloroplast compartments. The results of experiments with mutants of the genes of the chloroplast carbonic anhydrases indicate that the activity of the chloroplast carbonic anhydrases determines the nature of changes in photosynthesis reactions in response to changes in environmental conditions. Possible mechanisms are proposed for participation of carbonic anhydrase in light-dependent processes in the chloroplast. Based on these findings, a hypothesis that carbonic anhydrases in chloroplasts function interdependently is developed.

Keywords: photosynthesis, higher plants, adaptation, chloroplasts, carbonic anhydrases

УДК 577.345

АДАПТАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕЗА В КЛЕТКАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* К ДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ: АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

© 2024 г. А.А. Волгушева*, И.В. Конюхов*, Т.К. Антал**,*#

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского государственного университета, Красноармейская ул., 1, Псков, 180000, Россия

#E-mail: taras_an@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Исследованы механизмы адаптации первичных реакций фотосинтеза у зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* к действию кадмия путем изучения динамики распределения ключевых показателей фотосинтеза в популяции клеток. Синхронную культуру микроводорослей инкубировали в течение 96 ч в присутствии 25 мкМ кадмия и регистрировали ОЖР-кривые у индивидуальных клеток на разных этапах инкубации с токсикантом с помощью оригинального микрофлуориметра. Анализ ОЖР-кривых позволил определить распределение среди клеток ключевых параметров ЖР-теста: F_V/F_M , ET_O/ABS , RC/ABS , которые характеризуют фотохимическую активность ФС II, электронный транспорт в ФС II и поглощение света активным центром ФС II. Адаптация первичных реакций фотосинтеза микроводорослей к действию кадмия сопровождалась появлением в культуре двух сравнимых по вкладу фракций клеток, которые сохраняли стабильность фотосинтетических характеристик в условиях индуцированного токсикантом нарушения энергетического баланса. Клетки первой фракции сохраняли умеренную активность ФС II за счет уменьшения размера антенны ФС II, в то время как клетки второй фракции обладали низкой фотохимической активностью ФС II, сохраняя размер антенны близкий контрольным клеткам.

Ключевые слова: флуоресценция хлорофилла, микрофлуориметрия, фотосинтез, микроводоросли, адаптация, кадмий.

DOI: 10.31857/S0006302924030063, EDN: OFWPXY

Внутрипопуляционная вариабельность клеток различных микроорганизмов является важным адаптационным механизмом, позволяющим увеличить шансы на выживание в условиях действия неблагоприятных факторов, в том числе при токсическом стрессе [1, 2]. Большинство современных исследований, направленных на изучение адаптационных механизмов микроводорослей, основываются на анализе данных, полученных на суспензионных культурах, то есть используются усредненные значения по популяции. В то же время роль изменений структуры популяции в ответ на стресс изучена в меньшей степени, в том числе из-за сложности регистрации параметров состояния отдельной клетки.

Вариабельность клеток микроорганизмов широко распространена в природе. В частности, в микробных колониях хорошо изучена неоднородность морфологических и метаболических характеристик клеток [3]. У зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* выявлены различия между клетками по скорости роста и деления [4]. Выявлены различия в физиологии, метаболизме и морфологии между отдельными клетками разных видов водорослей в условиях недостатка биогенных элементов [5]. Ранее нами показано, что в популяции *Chlorella sorokiniana* при действии токсиканта 2,3',4,4',6-пентахлорбифенила выживает только 2–3% клеток, которые обладают высокой устойчивостью фотосинтеза к данному веществу [6].

Фотосинтетическая активность является одним из ключевых индикаторов физиологического состояния фототрофов и широко используется

Сокращения: ФХ – флуоресценция хлорофилла, ППФ – плотность потока фотонов.

при изучении ответных реакций организма на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Одними из наиболее быстрых и информативных подходов к изучению первичных реакций фотосинтеза являются методы регистрации флуоресценции хлорофилла (ФХ), в том числе кривых световой индукции ФХ (так называемых ОЛР-кривых). Типичная ОЛР-кривая представляет собой индуцированную вспышкой света высокой интенсивности кинетическую кривую роста выхода ФХ от минимального значения F_0 (точка О) у адаптированного к темноте образца с окисленным состоянием переносчиков электронов фотосинтетической электрон-транспортной цепи до максимального уровня F_M (пик Р), когда электрон-транспортная цепь переходит в полностью восстановленное состояние. На такой кривой обычно наблюдаются три фазы роста выхода ФХ: ОJ (от 5–40 мкс до 2–3 мс), JI (от 2–3 мс до 20–30 мс) и IP (от 20–30 мс до 100–200 мс), которые обусловлены тремя последовательными процессами восстановления электрон-транспортной цепи. ОJ-фаза (так называемая фотохимическая фаза) зависит от интенсивности возбуждающего света и отражает частичное восстановление акцепторной стороны ФС II, а именно, хинонных акцепторов Q_A (в большей степени) и Q_B (в меньшей степени) [7]. Считается, что последующие за точкой J фазы JI и IP обусловлены дополнительным восстановлением акцепторной стороны ФС II, увеличением энергизации тилакоидных мембран и конформационными изменениями ФС II [8–10]. Для анализа ОЛР-кривой часто используется JIP-тест [11, 12], позволяющий оценивать процессы преобразования световой энергии и эффективность первичных реакций фотосинтеза.

В настоящей работе исследовали механизмы адаптации культуры *C. reinhardtii* к токсическому действию одного из наиболее актуальных промышленных токсикантов – кадмия – путем анализа распределения ключевых показателей фотосинтетической активности в популяции клеток. В целом, механизмы токсического действия данного токсиканта на первичные реакции фотосинтеза хорошо изучены на высших растениях и микроводорослях [13, 14], однако влияние кадмия на гетерогенность популяции микроводорослей остается малоизученным.

В данной работе гетерогенность популяции *C. reinhardtii* изучали путем анализа ОЛР-кривых, измеренных на индивидуальных водорослевых клетках с помощью оригинального микрофлуориметра, разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [15]. Необходимо отметить, что микрофлуориметрический метод ранее использовали, в основном, для анализа распределения параметра JIP-теста F_V/F_M , отра-

жающего фотохимическую активность ФС II, в популяции микроводорослей [16, 17]. Этот параметр связан с самым первым (фотохимическим) этапом преобразования энергии в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Однако анализ ОЛР-кривых позволяет определять и другие важные показатели первичных реакций фотосинтеза.

Ранее нами было показано, что форма кинетической кривой ОЛР индивидуальной водорослевой клетки, измеренной с помощью оригинального микрофлуориметра, соответствует типичной кривой, измеренной в суспензии микроводорослей с помощью стандартных флуориметров, таких как РЕА и МРЕА (Hansatech, Великобритания) [18]. Однако кривая индивидуальной клетки характеризуется рядом особенностей, обусловленных использованием очень высокой интенсивности возбуждающего света в микрофлуориметре: плотность потока фотонов (ППФ) 15000 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$, в то время как в стандартном флуориметре ППФ обычно составляет 3000 – 5000 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. Необходимость использования такой высокой интенсивности света в микрофлуориметре связана с тем, что сигнал ФХ от индивидуальной клетки очень мал, и его регистрация сопровождается существенным вкладом шумовой компоненты. Поскольку выход ФХ пропорционален интенсивности возбуждающего света, то повышение интенсивности света сопровождается увеличением выхода ФХ и, соответственно, ростом отношения сигнал/шум. К характерным особенностям ОЛР-кривой индивидуальной клетки относятся: высокая скорость начального роста выхода ФХ (фаза ОJ) и занижение величины пика Р (F_M) вследствие раннего развития процессов нефотохимического тушения [18].

В нашей работе путем анализа ОЛР-кривых индивидуальных клеток *C. reinhardtii* оценивали внутривидовое распределение следующих ключевых характеристик первичных реакций фотосинтеза: максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС II (F_V/F_M), квантового выхода электронного транспорта (ET_0/ABS) и отношения активных реакционных центров к поглощенному свету (RC/ABS). Полученные результаты указывают на то, что адаптация первичных реакций фотосинтеза у *C. reinhardtii* к действию кадмия на уровне структуры популяции сопровождается появлением разных типов клеток со специфическими свойствами ФС II, которые определяют устойчивость фотосинтеза к условиям энергетического дисбаланса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование микроводорослей. В качестве объекта исследования использовали синхронную культуру *Chlamydomonas reinhardtii*, выращенную на минеральной среде HS [19]. Культуры растили в течение 72 ч до концентрации ~ 3 мкг хлорофилла·мл⁻¹ в конических колбах Эрленмейера объемом 100 мл на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин⁻¹ и температуре 25°C. Использовался следующий режим периодического освещения: 10 ч свет (люминесцентные лампы, плотность потока фотонов (ППФ) 100 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹), 14 ч темнота.

Полученную синхронную культуру разливали в колбы Эрленмейера объемом 50 мл и добавляли кадмий (в виде CdSO₄) в конечной концентрации 25 мкМ. Ранее нами было показано, что схожая концентрация кадмия индуцирует долгосрочные изменения, обусловленные процессами адаптации и фотодеструкции первичных реакций фотосинтеза в культурах микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sorokiniana* [14]. Затем контрольные и обработанные клетки помещали на постоянный свет (ППФ 40 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) и инкубировали в течение 72 ч на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин⁻¹ и температуре 25°C.

Регистрация ОЖР-кривых. ОЖР-кривые регистрировали на индивидуальных клетках *C. reinhardtii* с помощью разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова микрофлуориметра, как описано ранее [15]. Источником возбуждения ФХ служил синий свет светодиодного источника с максимумом полосы излучения 445 нм и ППФ 15000 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹. Перед измерением ФХ в суспензию клеток добавляли этанол в конечной концентрации 0.3% для обездвиживания клеток, после чего выдерживали образец в темноте в течение 5 мин. Затем образец с клетками помещали в камеру Горяева и проводили измерения с помощью микрофлуориметра, настраивая фокус на отдельную клетку. На индивидуальной клетке последовательно регистрировали минимум 10 индукционных кривых каждая длительностью 200 мс с темновым периодом между измерениями 20 с, после чего кривые усредняли. Технические повторности проводили для накопления сигнала и повышения отношения сигнал/шум на ОЖР-кривых.

Анализ ОЖР-кривых. Для анализа ОЖР-кривых использовали ЖР-тест [11]. Сначала определяли следующие характеристические точки на ОЖР-кривых:

– интенсивность ФХ при 20 мкс (F_0), 300 мкс ($F_{300 \text{ мкс}}$), 2 мс (F_J), 20 мс (F_I);

– величину максимального выхода ФХ на ОЖР-кривой (F_M).

Затем полученные результаты использовали для расчета следующих избранных параметров ЖР-теста:

1) максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС II ($F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$);

2) квантового выхода электронного транспорта ($ET_0/ABS = F_V/F_M \times (1 - V_J)$, где $V_J = (F_J - F_0)/F_M$);

3) отношения активных реакционных центров к поглощенному свету ($RC/ABS = [(F_{2 \text{ мкс}} - F_0)/(4 \times (F_{300 \text{ мкс}} - F_0))] \times (F_V/F_M)$).

Статистический анализ. Представленные результаты (ОЖР-кривые) получены в 3 биологических повторностях, каждая из которых являлась результатом усреднения минимум 10 технических повторностей. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One way ANOVA) и параметрического критерия Тьюки (Tukey test). Различия между показателями при $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены типичные ОЖР-кривые индивидуальных клеток *C. reinhardtii*, полученные в культурах до обработки (рис. 1а, 0 ч) и через 72 ч после обработки 25 мкМ кадмия (рис. 1б). Видно, что кривые в клетках контрольной культуры характеризовались типичной формой с тремя фазами роста ФХ: ОЖ, ЖИ и ИР. Нормировка сигнала ФХ на F_0 в контроле выявила статистически достоверную вариабельность ОЖР-кривых по величине переменной флуоресценции (F_V/F_0) (три типа кривых, рис. 1а). При этом форма ОЖР-кривых характеризовалась стабильностью и слабо изменялась внутри контрольной популяции клеток. Этот результат свидетельствует о том, что клетки в культуре, выращенной в условиях, близких к оптимальным для фотосинтеза, различались по величине фотохимической активности ФС II.

Более выраженные различия между ОЖР-кривыми индивидуальных клеток наблюдались через 72 ч инкубации *C. reinhardtii* в присутствии кадмия (рис. 1б). При этом ожидаемо наблюдалось снижение общего выхода величины F_V/F_0 по сравнению с контролем, а также возрастала вариабельность кривых по величине F_V/F_0 . Так, в обработанной культуре одновременно присутствовали клетки с величиной F_V/F_0 как в контроле (рис. 1а) и клетки с практически отсутствующей переменной ФХ, что свидетельствует об очень

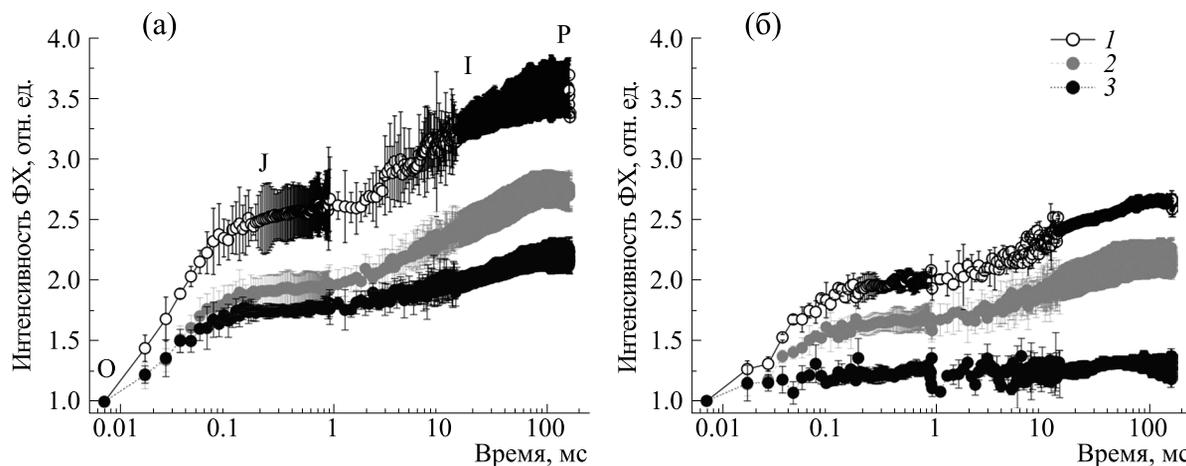


Рис. 1. Типичные OJIP-кривые индивидуальных клеток *C. reinhardtii* в 0 ч (а) и через 72 ч инкубации (б) в присутствии 25 мкМ Cd; 1, 2, 3 – кривые представляют фракции клеток с разной фотохимической активностью. Кривые нормированы на величину F_0 .

низкой фотохимической активности ФС II. Для более детального анализа влияния кадмия на гетерогенность популяции *C. reinhardtii* по показателям первичных реакций фотосинтеза мы исследовали динамику распределения в популяции ключевых параметров JIP-теста: F_V/F_M , ET_0/ABS , RC/ABS , рассчитанных из OJIP-кривых индивидуальных клеток.

На рис. 2 показано влияние кадмия на распределение величины параметра F_V/F_M среди клеток культуры *C. reinhardtii*. На начальной стадии эксперимента (0 ч, до добавления кадмия) величина F_V/F_M варьировала от 0.5 до 0.8, при этом примерно половина клеток (53%) характеризовалась значениями F_V/F_M в интервале 0.5–0.6, а остальные клетки показывали более высокие значения.

Данный результат свидетельствует о достаточно высокой гетерогенности контрольной культуры микроводорослей по величине фотохимической активности ФС II. Несколько заниженные значения фотохимической активности ФС II от ожидаемых обусловлены особенностями метода регистрации OJIP-кривых индивидуальных клеток как упоминалось выше. Так, в оптимальных условиях роста микроводорослей величина F_V/F_M , измеренная в суспензии клеток *C. reinhardtii* стандартными методами, составляет ~0.7.

Под влиянием кадмия наблюдалось резкое увеличение гетерогенности культуры *C. reinhardtii* по величине F_V/F_M , сопровождавшееся появлением фракций клеток с низкими значениями этого параметра (в интервале 0.1–0.3) (рис. 2). Через 24 ч токсического действия практически у поло-

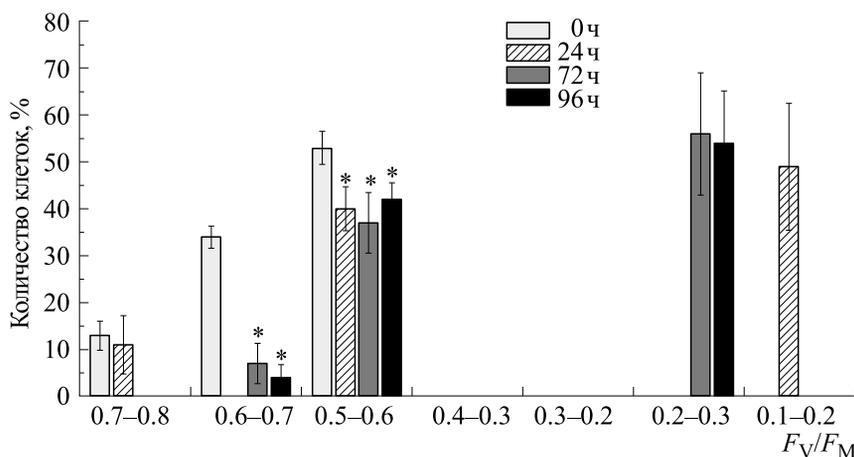


Рис. 2. Распределение величины F_V/F_M среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72 и 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток. * – Достоверные различия величины F_V/F_M у обработанных кадмием (24, 72 и 96 ч) по сравнению с необработанными (0 ч) клетками.

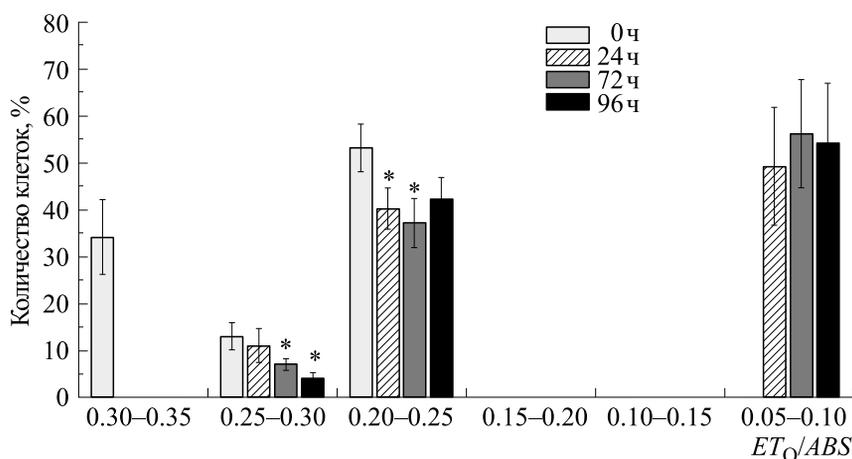


Рис. 3. Распределение величины ET_O/ABS среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72, 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток. * – Достоверные различия величины ET_O/ABS у обработанных кадмием (24, 72 и 96 ч) по сравнению с необработанными (0 ч) клетками.

вины клеток в популяции наблюдались очень низкие значения F_V/F_M (0.1–0.2), в то время как примерно 10% клеток сохраняли максимальные значения F_V/F_M (> 0.7). Очевидно, что фракция клеток с высокой фотохимической активностью ФС II характеризуется в целом высокой толерантностью к кадмию. Более длительная инкубация с токсикантом (до 96 ч) приводила к стабильному преобладанию двух типов клеток со значениями F_V/F_M в интервалах 0.5–0.6 и 0.2–0.3. Этот результат указывает на некоторое снижение гетерогенности популяции клеток по фотохимической активности по сравнению с начальной стадией действия кадмия (24 ч). Практически одинаковое распределение величины F_V/F_M на поздних стадиях эксперимента (72 и 96 ч) свидетельствует об отсутствии значительных изменений в структуре популяции по величине фотохимической активности ФС II, скорее всего вследствие частичной адаптации фотосинтетического аппарата к токсическому стрессу.

Параметр ET_O/ABS (активность электронного транспорта) является более комплексным по сравнению с F_V/F_M , поскольку характеризует два последовательных первичных процесса фотосинтеза: фотохимическое преобразование энергии в ФС II (способность к восстановлению Q_A) и способность к переносу электрона с Q_A ФС II в пластохиноновый пул [11]. В отличие от параметра F_V/F_M , который может быть измерен с помощью различных технических подходов и поэтому получил широкое распространение [20–22], ET_O/ABS можно корректно оценить только из ОЖР-кривых. ET_O/ABS эмпирически и теоретически обоснован и может рассматриваться в каче-

стве одного из ключевых параметров ЖР-теста [7].

Влияние кадмия на распределение величины ET_O/ABS среди клеток культуры *C. reinhardtii* показано на рис. 3. До обработки клеток (0 ч) величина ET_O/ABS варьировала в диапазоне 0.2–0.3, при этом распределение клеток по данному параметру было сходным с распределением F_V/F_M в 0 ч (рис. 2), указывая на то, что распределение ET_O/ABS в контрольной культуре определялось, в основном, распределением F_V/F_M . Инкубация с токсикантом в течение 24 ч приводила к появлению двух основных фракций клеток: с величиной ET_O/ABS в интервалах 0.20–0.25 (40%) и 0.05–0.10 (50%). При этом сохранялась незначительная фракция клеток (10%) с высокой величиной ET_O/ABS (0.25–0.30). Более длительная инкубация культуры (72 и 96 ч) существенно не изменяла распределение клеток, наблюдаемое в 24 ч, при этом характер распределения ET_O/ABS в интервале 72–96 ч походил на таковой для F_V/F_M (рис. 2). Таким образом, изменения активности электронного транспорта при действии кадмия в целом определялись изменениями фотохимической активности ФС II, и, соответственно, компонент, связанный с электронным транспортом с ФС II в пластохиноновый пул, не изменялся значительно в наших экспериментальных условиях. Динамика распределения активности электронного транспорта среди клеток *C. reinhardtii* в присутствии кадмия характеризовалась большей стабильностью по сравнению с фотохимической активностью ФС II, поскольку основные изменения происходили в течение первых 24 ч, а затем носили минорный характер.

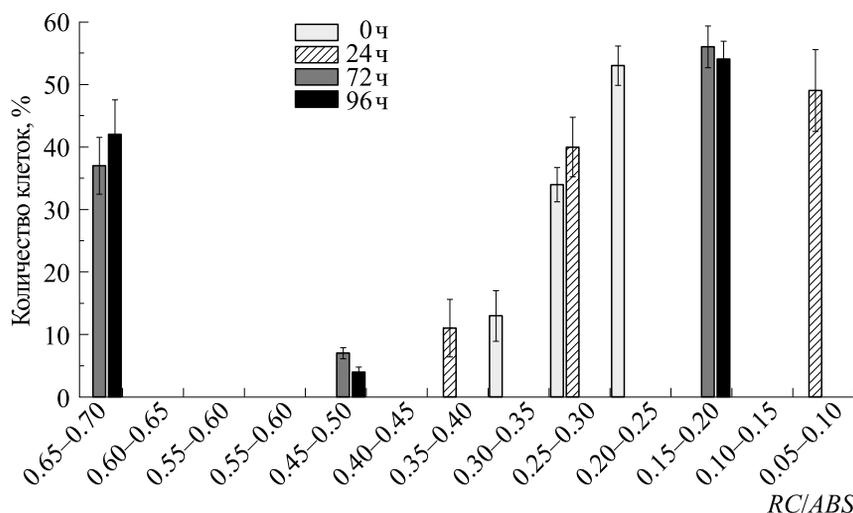


Рис. 4. Распределение величины RC/ABS среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72, 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток.

Параметр RC/ABS также является важной характеристикой первичных реакций фотосинтеза, отражая количество фотохимически активных центров ФС II, нормированных на светопоглощение, которое пропорционально содержанию фотосинтетических пигментов. Считается, что обратная величина (параметр ABS/RC) отражает размер светособирающей антенны активного центра ФС II.

Распределение RC/ABS среди клеток *C. reinhardtii* в присутствии кадмия показано на рис. 4. В течение всего периода инкубации микроводорослей наблюдали изменения значений данного параметра в широком диапазоне: от 0.05 до 0.70. В культуре до добавления кадмия (0 ч) величина RC/ABS у клеток варьировала в интервале 0.20–0.35, при этом более половины клеток характеризовались значениями в узком диапазоне значений: от 0.20 до 0.25. Воздействие токсиканта в течение 24 ч приводило к появлению фракции клеток (около 50%) с низкими значениями RC/ABS в интервале 0.05–0.10. Сопоставление этих изменений с изменениями F_V/F_M (рис. 2) указывает на то, что основной причиной снижения величины RC/ABS через 24 ч инкубации является подавление фотохимической активности центров ФС II у значительной части водорослевых клеток. Инкубация культуры в присутствии кадмия в течение 72 и 96 ч сопровождалась появлением двух доминирующих фракций клеток со значениями RC/ABS в достаточно узких интервалах: 0.15–0.20 (~40%) и 0.65–0.70 (~55%). Очевидно, что появление клеток с высокими значениями RC/ABS (в два-три раза выше, чем в контрольных клетках) обусловлено снижением светопоглощения вследствие снижения содержания фотосинтетических пигментов, в первую очередь, хлорофилла в клет-

ках. Распределение RC/ABS в интервале инкубации от 72 до 96 ч практически не изменялось, указывая на стабильное соотношение между активными реакционными центрами и поглощенным светом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кадмий индуцирует снижение размера светособирающей антенны активного центра ФС II у значительного количества обработанных клеток. Действительно, ранее было показано, что действие кадмия на фотосинтетический аппарат *C. reinhardtii* сопровождается общим снижением содержания хлорофилла в клетках и размера светособирающей антенны ФС II [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные высокочувствительные методы измерения ФХ предоставляют перспективную возможность измерения ОЖР-кривых на индивидуальных водорослевых клетках, что позволяет исследовать механизмы адаптации микроводорослей к стрессовым воздействиям, связанные с реорганизацией структуры популяции клеток. В представленном исследовании мы впервые охарактеризовали влияние кадмия на гетерогенность культуры *C. reinhardtii* путем измерения и анализа кинетических кривых ФХ индивидуальных клеток. Анализ кривых проводили путем расчета ключевых параметров ЖР-теста: F_V/F_M , ET_O/ABS и RC/ABS . Нами показано, что адаптация культуры *C. reinhardtii* к токсическому действию сопровождается появлением нескольких типов клеток:

1) клеток с умеренной и низкой фотохимической активностью (F_V/F_M в интервалах 0.5–0.6 (~40% от общего числа) и 0.2–0.3 (~55% соответственно);

2) клеток с высоким и низким отношением фотохимически активных центров ФС II к поглощенному свету (RC/ABS в интервалах 0.65–0.70 (~40%) и 0.15–0.20 (~55%) соответственно).

Сопоставление распределения F_v/F_m и RC/ABS позволяет сделать вывод о том, что через 72 ч инкубации *C. reinhardtii* в присутствии кадмия формируются две стабильные и сравнимые по вкладу фракции клеток. Клетки первого типа, доля которых составляет около 40% от общего числа, характеризуются умеренной фотохимической активностью и малым размером антенны ФС II, в то время как клетки второго типа с долей около 55% обладают низкой фотохимической активностью и характерным для контрольных клеток размером антенны ФС II.

Таким образом, изменения первичных реакций фотосинтеза в клетках *C. reinhardtii* под действием кадмия протекают наиболее вероятно по двум возможным путям. Первый путь предполагает сохранение умеренной активности ФС II в клетке за счет уменьшения размера светособирающей антенны на активный центр ФС II. Так, малый размер антенны ФС II снижает избыточное возбуждение реакционных центров в условиях дисбаланса между поглощением и потреблением энергии в процессах фотосинтеза, индуцированного кадмием. Таким образом, снижается образование активных форм кислорода в ФС II и, соответственно, фотодеструкция ФС II. Второй путь обусловлен переходом ФС II в малоактивное состояние (с активностью менее 25% от контрольного уровня), в котором ФС II также сохраняет устойчивость к деструктивным реакциям. Дальнейшее изучение феномена множественности путей адаптации клеток микроводорослей к стрессовому воздействию должно включать изучение механизмов запуска («выбора» клеткой) того или иного адаптационного механизма на ранних стадиях токсического стресса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00353).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Магданова Л. А. и Голясная Н. В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. *Микробиология*, **82** (1), 3–13 (2013). DOI: 10.7868/S0026365613010072
2. Wang X. and Wang W. X. Cell cycle-dependent Cu uptake explained the heterogenous responses of *Chlamydomonas* to Cu exposure. *Environ. Pollut.*, **319**, 121013 (2023). DOI: 10.1016/j.envpol.2023.121013
3. Altschuler S. J. and Wu L. F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, **141** (4), 559–563 (2010). DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.033
4. Damodaran S. P., Eberhard S., Boitard L., Rodriguez J. G., Wang Y., Bremond N., Baudry J., Bibette J., and Wollman F. A. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One*, **10** (3), e0118987 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0118987
5. Yan P., Guo J. S., Zhang P., Xiao Y., Li Z., Zhang S. Q., Zhang Y. X., and He S. X. The role of morphological changes in algae adaptation to nutrient stress at the single-cell level. *Sci. Total Environ.*, **754**, 142076 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142076
6. Volgusheva A. A., Todorenko D. A., Konyukhov I. V., Voronova E. N., Pogosyan S. I., Plyusnina T. Y., Khrushev S. S., and Antal T. K. Acclimation Response of Green Microalgae *Chlorella Sorokiniana* to 2,3',4,4',6-Pentachlorobiphenyl. *Photochem. Photobiol.*, **99** (4), 1106–1114. (2023). DOI: 10.1111/php.13771
7. Schansker G., Tóth S. Z., Kovács L., Holzwarth A. R., Garab G. Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise. *Biochim. Biophys. Acta*, **1807** (9), 1032–43 (2011). DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.05.022
8. Vredenberg W. J., Bulychev A. Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II *in vivo*. Kinetics in the absence and presence of valinomycin. *Bioelectrochemistry*, **60** (1–2), 87–95 (2003). DOI: 10.1016/s1567-5394(03)00053-7
9. Stirbet A. and Govindjee. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth. Res.*, **113** (1–3), 15–61 (2012). DOI: 10.1007/s11120-012-9754-5
10. Sipka G. B., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J. R., Lambrev P. H., and Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell*, **33** (4), 1286–1302 (2021). DOI: 10.1093/plcell/koab008
11. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., and Srivastava A. In *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*, Eds. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), p. 321. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9_12
12. Lázár D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light.

- Funct. Plant Biol.*, **33** (1), 9–30 (2006). DOI: 10.1071/FP05095
13. Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., and Antal T. Multiple *in vivo* Effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants. *Photochem. Photobiol.*, **97** (6), 1516–1526 (2021). DOI: 10.1111/php.13469
 14. Volgusheva A., Todorenko D., Baizhumanov A., Chivkunova O., Solovchenko A., and Antal T. Cadmium- and chromium-induced damage and acclimation mechanisms in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.*, **34**, 1435–1446 (2022). DOI: 10.1007/s10811-022-02747-6
 15. Kuznetsov A. G., Konyukhov I. V., Pogosyan S. I., and Rubin A. B. Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae *Oceanology*, **61** (6), 1055–1063 (2021). DOI: 10.1134/S0001437021060278
 16. Погосян С. И., Сивченко М. А. и Максимов В. Н. Физиологическая гетерогенность популяции микроводорослей. Классификация цинобиев *Scenedesmus quadricauda* по типам кривых индукции флуоресценции хлорофилла. *Изв. РАН. Сер. биол.*, **3**, 337–373 (1996).
 17. Voronova E. N., Il'ash L.V., Pogosyan S. I., Ulanova A. Yu., Matorin D. N., Man-gi Cho, and Rubin A. B. Intrapopulation heterogeneity of the fluorescence parameters of the marine plankton alga *Thalassiosira weissflogii* at various nitrogen levels. *Microbiology*, **78**, 419–427 (2009). DOI: 10.1134/S0026261709040043
 18. Волгушева А. А., Конюхов И. В. и Антал Т. К. Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом. *Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология*, **78** (3), 170–177 (2023). DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-4
 19. Harris E. H. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Ed. by E. H. Harris (Academic Press, San Diego, 1989). DOI: 10.1126/science.246.4936.1503-a
 20. Маторин Д. Н., Осипов В. А., Яковлева О. В. и Погосян С. И. *Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла* (МАКС Пресс, Москва, 2010)
 21. Маторин Д. Н. и Рубин А. Б. *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей* (Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск-Москва, 2012).
 22. Маторин Д. Н. и Горячев С. Н. *Флуоресценция хлорофилла микроводорослей в биотестировании загрязнений* (Альтекс, Москва, 2017).
 23. Thiriet-Rupert S., Gain G., Jadoul A., Vigneron A., Bosman B., Carnol M., Motte P., Cardol P., Nouet C., and Hanikenne M. Long-term acclimation to cadmium exposure reveals extensive phenotypic plasticity in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.*, **187** (3), 1653–1678 (2021). DOI: 10.1093/plphys/kiab375

Acclimation of Primary Photosynthetic Reactions in the Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* to Cadmium: Analysis of Cell Population Heterogeneity

A.A. Volgusheva*, I.V. Konyukhov*, and T.K. Antal**

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University, Krasnoarmeyskaya ul. 1, Pskov, 180000 Russia

The mechanisms of acclimation of primary photosynthetic reactions in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to the toxic action of cadmium were investigated by analyzing the dynamics of distribution of key photosynthetic parameters in cell population. A synchronous culture of microalgae was incubated for 96 h in the presence of 25 μM Cd, and OJIP-transient curves of individual cells were recorded at different stages of incubation with the toxicant using an original microfluorimeter. The analysis of OJIP-transient curves made it possible to determine distributions of key JIP-test parameters: F_v/F_M , ET_0/ABS , RC/ABS , which represent photochemical activity of PS II, electron transport in PS II, and light absorption per active reaction center in PS II, respectively. Acclimation of primary photosynthetic reactions in microalgae to cadmium was accompanied by the appearance of two dominating cell fractions, which demonstrated the stable values of photosynthetic parameters when energy imbalance occurred due to the presence of the toxicant. The cells related to the first fraction retained moderate PS II activity by the effect of reduced PS II antenna size, while the cells of the second fraction showed low photochemical activity of PS II keeping antenna size similar to those of control cells.

Keywords: chlorophyll fluorescence, microfluorometry, photosynthesis, microalgae, acclimation, cadmium

УДК 51-76

ОЦЕНКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ АНТЕННЫ И АКТИВНОСТИ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ II МАТЕМАТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

© 2024 г. Н.С. Дегтерева*, Т.Ю. Плюснина*,#, С.С. Хрущев*, Р.Н. Червицов*, Е.Н. Воронова*, О.В. Яковлева*, Т.К. Антал**, Г.Ю. Ризниченко*, А.Б. Рубин*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского государственного университета, Советская ул., 21, Псков, 180000 Россия

#E-mail: plusn@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.03.2024 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Фотосистема II — один из основных пигмент-белковых комплексов фотосинтеза, обладающий высокой чувствительностью к неблагоприятным факторам внешней среды. Неоднородность свойств фотосистемы II необходима для устойчивости автотрофных организмов к стрессовым факторам. Оценка гетерогенности фотосистемы II может быть использована в экологическом мониторинге для оперативного выявления загрязнения окружающей среды. Предлагается комплексный подход к оценке гетерогенности фотосистемы II, основанный на математическом анализе формы кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* образцов, обработанных 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевинной с помощью математической модели и параметров ЛП-теста. Были проанализированы кривые индукции флуоресценции, полученные для обработанных образцов культуры клеток *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Pleurochloris* и *Stichococcus* при выращивании на свету интенсивностью 8 и 16 Вт·м⁻². Для всех случаев проведена оценка соотношения реакционных центров с различным размером антенн (альфа- и бета-центров), а также определена доля активных и неактивных кислород-выделяющих комплексов.

Ключевые слова: фотосистема II, математическая модель, гетерогенность реакционного центра.

DOI: 10.31857/S0006302924030072, EDN: OFUFTW

Пигмент-белковые комплексы фотосистемы II (ФСII) хорошо изучены в экспериментальных и модельных исследованиях. Форма кривых индукции флуоресценции, отражающих динамику переходов между состояниями ФСII, является чувствительным индикатором состояния реакционного центра ФСII. Изменение формы кривой свидетельствует об изменениях в тех или иных структурах реакционного центра ФСII и отражает изменение внешних условий или действие стресса. Реакционные центры ФСII гетерогенны по своей природе. Гетерогенность может проявляться в строении и размере светособирающей антенны. Еще одним вариантом гетерогенности ФСII являются Q_B-невосстанавливающие центры, в которых частично или полностью заблокирован

перенос электрона с первичного хинона на вторичный. Донорная часть ФСII, связанная с кислород-выделяющим комплексом (КВК), также может проявлять гетерогенность вследствие различной активности КВК. Так, в работе [1] для культуры водоросли *Chlamydomonas* было показано, что 12–16% реакционных центров (РЦ) в мембранах, обогащенных ФСII, не имеют марганцевых кластеров, входящих в состав кислород-выделяющих комплексов. Было высказано предположение, что это связано с тем, что часть реакционных центров ФСII в препаратах находится в процессе сборки или деградации [1, 2].

Гетерогенность антенны ФСII была впервые описана в работах [3, 4]. Анализируя кинетику подъема кривой индукции флуоресценции адаптированных к темноте хлоропластов в присутствии ингибитора ФСII диурона (N-(3,4-дихлорфенил)-N-диметилмочевины — DCMU), авторы выдвинули предположение о существовании двух

Сокращения: ФСII — фотосистема II, КВК — кислород-выделяющий комплекс, РЦ — реакционный центр, DCMU — N-(3,4-дихлорфенил)-N-диметилмочевина (диурон).

популяций ФСII. Известно, что комплементарная площадь над кривой индукции флуоресценции (площадь между кривой флуоресценции и горизонтальной линией на максимальном уровне флуоресценции F_m) в присутствии DCMU пропорциональна количеству фотосистем, способных осуществлять восстановление первичного хинона Q_A [5, 6]. Авторы работ [3, 4], рассматривая в полулогарифмическом масштабе кинетику индукции флуоресценции в присутствии DCMU, обнаружили две фазы с различными характерными временами и соотнесли их с двумя популяциями ФСII, а именно, ФСII α и ФСII β . В дальнейшем была обнаружена и третья, еще более медленная, фаза, которую соотнесли с популяцией ФСII γ [7, 8].

Работы, в которых были получены трехмерные структуры ассоциированных с ФСII светособирающих комплексов, появились сравнительно недавно [9, 10]. Более ранние предположения о строении реакционных центров ФСII α , ФСII β и ФСII γ основывались на исследовании кинетики индукции флуоресценции. Считалось, что реакционные центры ФСII γ имеют только «коровую» антенну (~50 молекул хлорофилла a), реакционные центры ФСII β в дополнение к коровой антенне имеют также внутреннюю антенну (суммарно ~130 молекул хлорофилла a и b), а в реакционных центрах ФСII α имеется также периферическая антенна (суммарно ~210–250 молекул хлорофилла a и b) [11, 12]. Доминирующая форма (ФСII α) локализована в гранях [13] и характеризуется наибольшей светособирающей антенной. Предполагается, что несколько реакционных центров ФСII α связаны общей антенной и способны передавать энергию возбуждения друг другу, что приводит к появлению сигмоидального участка на кривой индукции флуоресценции в присутствии DCMU [14]. Однако в работе [15] экспериментально было показано, что сигмоидальный участок может появиться и в условиях отсутствия связности (когда реакционные центры содержат только коровую антенну), а его появление может быть связано, как предполагают авторы процитированной работы, с конформационными изменениями в реакционном центре. ФСII β располагаются в основном в стромальной области и характеризуются примерно в 2 раза меньшим размером светособирающей антенны по сравнению с ФСII α , а также невозможностью передачи возбуждения между реакционными центрами, что приводит к экспоненциальной кинетике кривой индукции флуоресценции в присутствии DCMU. Процессы разделения зарядов и излучения флуоресценции в α - и β -центрах предполагаются сходными [16].

Сообщалось, что стресс, вызываемый действием окружающей среды, может влиять на гете-

рогенность ФСII, увеличивая долю реакционных центров ФСII β [17–20]. Как было показано в работе [21], размер антенны может меняться и в процессе адаптации к стрессу. Таким образом, анализ неоднородности реакционных центров по размеру светособирающей антенны может быть использован для определения структурных и/или функциональных изменений в условиях стресса, которые могут оказать негативное влияние на продуктивность ФСII и рост биомассы.

Для оценки размера антенны ФСII применяются различные методы, основанные на регистрации индуцированных светом изменений поглощения ее компонентов [22], регистрации скорости фиксации CO_2 [23], стационарной скорости выделения кислорода [24], мгновенного выхода кислорода [25] или мгновенного высвобождения протонов [26]. Однако применение таких методов возможно лишь в условиях *in vitro* и позволяет получить лишь достаточно грубые усредненные оценки размера антенны.

Другой подход основан на анализе формы кривой индукции флуоресценции хлорофилла a в присутствии DCMU математическими методами [27] и позволяет выявить существование нескольких пулов реакционных центров ФСII с различным размером антенны, т.е. охарактеризовать ее гетерогенность. Получение индукционных кривых в присутствии DCMU не вызывает трудностей и позволяет получать обширные наборы таких кривых, например, на разных стадиях адаптации растительных организмов к стрессу. Это дает возможность оценить динамику изменения гетерогенности антенны ФСII в процессе развития стресса.

Математические методы, используемые для обработки кривых индукции флуоресценции, удобны тем, что позволяют достаточно быстро провести анализ большого количества экспериментальных кривых. Одним из наиболее широко используемых математических методов выявления различных типов реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ) является выделение нескольких экспоненциальных фаз с различными характерными временами на площади между кривой индукции флуоресценции, отложенной в полулогарифмическом масштабе, и горизонтальной линией на максимальном уровне флуоресценции F_m (комплементарной площади). Наличие нескольких экспоненциальных фаз, как правило, соотносят с существованием нескольких популяций реакционных центров с разным размером светособирающей антенны: ФСII α , ФСII β и ФСII γ . Однако, как указывалось в работах [27, 28], точность метода разложения на экспоненты очень сильно зависит от точности определения максимума индукционной кривой значения F_m . Ошибка на 2–3% в определении F_m , может приве-

сти к ошибке на 100% в определении характерных времен и амплитуд фаз на кривой. В связи с этим было предложено [27] использовать для анализа индукционных кривых математическую модель ФСИ. В этом случае нет необходимости использовать комплементарные площади, а оценка гетерогенности производится непосредственно с помощью модели, путем идентификации ее параметров по экспериментальным данным. Для анализа гетерогенности реакционных центров в образцах *Chlamydomonas*, обработанных DCMU, в работах [27, 29] была использована простая модель, рассматривающая два состояния ФСИ – «открытые» и «закрытые» реакционные центры. Комбинация из нескольких таких моделей позволила авторам оценить долю различных реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ). Однако необходимо отметить, что фазы, обнаруживаемые на индукционной кривой в присутствии DCMU, могут отражать как наличие реакционных центров ФСИ с антеннами различного размера, так и процессы с различными характерными временами, происходящие в одном реакционном центре, на что было указано в работах [3, 4]. Использование модели, включающей только два состояния [27, 29], не может ответить на вопрос, с чем соотносится дополнительная экспоненциальная фаза на кривой комплементарной площади – с другим типом антенны или с каким-либо процессом, поскольку единственная реакция в такой модели характеризует лишь световую стадию переноса электрона. В работе [30] нами был предложен метод, основанный на иерархии времен процессов ФСИ, позволивший корректно упростить детальную модель ФСИ и свести систему из 24 дифференциальных уравнений к системе из 2-х дифференциальных уравнений. Такой подход позволил получить редуцированную модель, параметры которой содержат все константы исходной детальной модели, что позволило после аппроксимации модели по экспериментальным кривым дать интерпретацию процессов в терминах детальной модели, рассматривая элементарные стадии переноса электронов. Для того чтобы использовать полученную редуцированную модель для оценки гетерогенности реакционных центров ФСИ, была предложена комбинация из 4-х таких моделей, отличающихся долями α - и β -центров (ФСII α , ФСII β) и долями активных и неактивных кислород-выделяющих комплексов. С помощью такого подхода было показано [30], что дополнительная фаза на кривой индукции флуоресценции образцов клеток водорослей, обработанных DCMU, при высокой интенсивности света (2000 мкЭ м⁻²с⁻¹ и выше) может соответствовать реакции перехода КВК из состояния S₁ в состояние S₂. В данной работе демонстрируется применение разработанной модели [30] в комплексе с

параметрами JIP-теста для оценки и анализа гетерогенности реакционных центров пяти различных видов микроводорослей, каждая из которых культивировалась при двух различных световых условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных культур водорослей. Культуры клеток пяти различных видов микроводорослей: зеленых (*Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Stichococcus*) и желто-зеленых (*Pleurochloris*) выращивали в течение 14 суток на среде Тамия в колбах Эрленмейера объемом 250 мл при температуре 24°C. Каждую из культур выращивали при постоянном освещении на двух различных интенсивностях света: 8 Вт/м² (35 мкЭ м⁻²с⁻¹) и 16 Вт/м² (70 мкЭ м⁻²с⁻¹). Пробы отбирали в среднелогарифмической фазе роста культуры (около 10 мкг хлорофилла/мл).

Отбор проб, обработка DCMU. Образцы клеточной суспензии разливали в колбы Эрленмейера емкостью 100 мл. Для нормализации данных, полученных в ходе различных экспериментов, суспензию водорослей разводили средой культивирования до оптической плотности при длине волны 680 нм $D = 0.1$ при длине оптического пути 1 см. Все дальнейшие операции с образцами проводились в полной темноте. После каждого этапа инкубации образец перемешивали, чтобы предотвратить осаждение клеток. Образцы оставляли в темноте на 10 мин. После этого добавляли раствор DCMU до достижения конечной концентрации 5 мкМ. Образцы инкубировали с DCMU в течение 5 мин перед измерением флуоресценции хлорофилла *a*.

Измерение кривых индукции флуоресценции. Индукционные кривые измеряли с помощью флуориметра МЕГА-25, разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова [31]. В качестве источника действующего света использовали светодиод с максимумом испускания на 455 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 670–750 нм с помощью кремниевого фотодиода. Измерение индукционных кривых проводили при 5 различных интенсивностях действующего света: $I_1 = 1840$ мкЭ м⁻²с⁻¹, $I_2 = 3440$ мкЭ м⁻²с⁻¹, $I_3 = 4900$ мкЭ м⁻²с⁻¹, $I_4 = 6230$ мкЭ м⁻²с⁻¹, $I_5 = 7500$ мкЭ м⁻²с⁻¹.

Подготовка экспериментальных данных для анализа с помощью модели. Для первичного анализа кривых индукции флуоресценции использовали программу ruPhotoSyn [32, 33]. Для каждой кривой было оценено время, необходимое для достижения максимальной интенсивности флуоресценции, и для аппроксимации модели были

взяты 200 точек с интервалом времени, в основном равномерным в логарифмическом масштабе. Для каждого эксперимента точки были нормализованы к минимальному значению (F_m), измеренному при самой низкой интенсивности света.

Математическая модель для анализа кривых индукции флуоресценции. В работе [30] была разработана детальная модель переходов между 24 состояниями ФСЦ, реализующимися при действии на ФСЦ ингибитора электронного транспорта диурана (DCMU). Диапазон характерных времен переходов между состояниями в ФСЦ составляет 9 порядков – от пикосекунд до сотен миллисекунд. Наличие такой иерархии времен позволило провести редукцию модели, используя теорему Тихонова [34]: все переменные системы были разделены на так называемые «быстрые» переменные – уравнения, которые содержат малый параметр при производной, и «медленные» – оставшиеся переменные, после чего уравнения для «быстрых» переменных были заменены на алгебраические. Исходная модель, состоящая из 24 обыкновенных дифференциальных линейных уравнений, была, таким образом, редуцирована в систему из 3-х обыкновенных дифференциальных линейных уравнений. Важно отметить, что решения исходной и редуцированной моделей различались только на интервале времени до сотен наносекунд, а далее совпадали на всем остав-

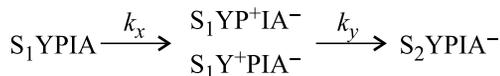


Рис. 1. Схема редуцированной системы, описывающая переходы в реакционном центре ФСЦ под действием DCMU. S_i – состояния КВК, Y – состояния тирозина, P – состояния P_{680} , I – состояния феофитина, A – состояния первичного хинона Q_A . $S_1 Y P I A$ – начальное состояние ФСЦ сразу после темновой адаптации, где КВК находится в состоянии S_1 , а все остальные переносчики находятся в нейтральном состоянии; $S_1 Y P^+ I A^-$ и $S_1 Y^+ P I A^-$ – два состояния, находящиеся в быстром равновесии, где КВК в состоянии S_1 , Q_A восстановлен, а электрон находится либо на тирозине Y , либо на P_{680} ; $S_2 Y P I A^-$ – состояние, где Q_A восстановлен, а КВК находится в состоянии S_2 .

шемся интервале времени. При этом диапазон экспериментальных измерений начинается от десятков микросекунд, т.е. редуцированная модель описывает экспериментальные кривые с той же точностью, что и исходная детальная модель. Таким образом, были выделены три ключевых состояния (рис. 1), динамика переходов между которыми определяет форму кривой индукции флуоресценции, полученной при обработке ФСЦ DCMU.

Система дифференциальных уравнений, описывающая переходы между ключевыми состояниями на рис. 1, имеет вид:

$$\frac{dx}{dt} = -k_x \cdot x, \quad \frac{dy}{dt} = k_x \cdot x - k_y \cdot y, \quad \frac{dz}{dt} = k_y \cdot y. \tag{1}$$

Учитывая закон сохранения $x + y + z = 1$, можно найти аналитическое решение:

$$x = \exp(-k_x \cdot t), \quad z = \frac{k_y}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) + \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) + 1, \quad y = 1 - x - z, \tag{2}$$

где k_x и k_y – параметры, состоящие из сочетаний констант элементарных стадий детальной модели [30]. Параметр k_x включает световую константу и константы разделения и рекомбинации зарядов в открытых центрах, по значению близок к световой константе. Параметр k_y включает константу переноса электрона от КВК на тирозин и кон-

станты восстановления и окисления P_{680} , по значению близок к константе переноса электрона от КВК на тирозин.

Выражение для интенсивности флуоресценции $F(t)$ состоит из «быстрых» переменных, однако после редукции системы его можно записать через «медленные» переменные с учетом аналитических выражений (2) как

$$F(t) = A_1 \cdot (1 - \exp(-k_x \cdot t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_y \cdot t)), \tag{3}$$

где

$$A_1 = -\frac{F_{or}}{1 - F_{or}} + \frac{k_y - k_x \cdot K_{pred} / (1 + K_{pred})}{(k_y - k_x) \cdot (1 - F_{or})},$$

$$A_2 = -\frac{k_x \cdot (1 - K_{pred} / (1 + K_{pred}))}{(k_y - k_x) \cdot (1 - F_{or})}, \quad K_{pred} - \text{константа}$$

равновесия в реакции переноса электрона от тирозина на P_{680} , F_{or} – параметр, аналогичный F_0 , минимальное значение флуоресценции для кривой, является сочетанием констант разделения зарядов в открытых и закрытых центрах, а также

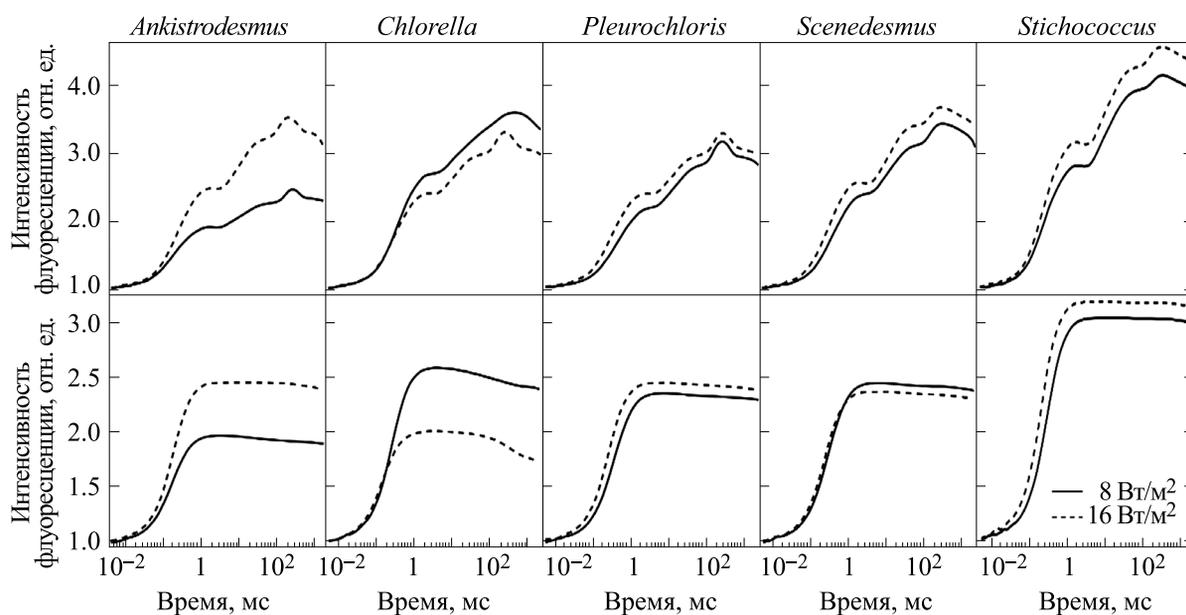


Рис. 2. Кривые индукции флуоресценции, нормированные на F_0 , без обработки DCMU (верхний ряд), с обработкой DCMU (нижний ряд). Интенсивность действующего света $I = 3440 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

константы рекомбинации. Конкретный вид выражений представлен в работе [30]. Таким образом, решение модели представляет собой двухфазную кривую, описываемую двумя экспоненциальными функциями, нарастание или спад которой будет определяться знаками амплитуд A_1 и A_2 , зависящими от конкретного сочетания входящих в них параметров.

Простой вид полученной модели позволяет составлять различные комбинации для моделирования гетерогенности антенны и гетерогенно-

сти донорной стороны ФСП. Флуоресценцию с учетом разных долей α - и β -центров можно записать как

$$F_{\alpha\beta} = \alpha \times F_{\alpha} + \beta \times F_{\beta},$$

где F_{α} и F_{β} – флуоресценция альфа- и бета-центров соответственно.

Каждый из вариантов реакционного центра ФСП может содержать как активный, так и неактивный КВК, что может быть отражено как

$$F_{\alpha} = s \times F_{\alpha}^{s+} + (1 - s) \times F_{\alpha}^{s-}, \quad F_{\beta} = s \times F_{\beta}^{s+} + (1 - s) \times F_{\beta}^{s-}, \quad (4)$$

где F_i^{s+} – флуоресценция i -го центра с активным КВК, F_i^{s-} – флуоресценция i -го центра с неактивным КВК, s – доля активных КВК. Таким образом, мы имеем комбинацию из 4-х моделей, в целом отражающую гетерогенность и антенны, и КВК.

Идентификация параметров модели и вычисление стандартных ошибок. Аппроксимацию математической модели по экспериментальным данным и построение соответствующих графиков проводили с помощью программы DBSolve [35]. Чтобы получить стандартные ошибки для оценок параметров, мы уточнили результаты аппроксимации с помощью пакета Imfit Python [36]. Графики моделей были созданы с использованием пакета Matplotlib Python [37].

Параметры JIP-теста. В дополнение к анализу индукционных кривых с помощью математиче-

ской модели, по индукционным кривым, зарегистрированным без обработки DCMU, были вычислены следующие параметры JIP-теста [38]: V_j – количество Q_B -невосстанавливающих центров, PI – индекс производительности, F_v/F_m – квантовый выход первичной фотохимии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью комбинированной модели были проанализированы кривые индукции флуоресценции, полученные для пяти различных видов водорослей (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Pleurochloris*, *Stichococcus*), выращенных при двух разных интенсивностях света: $I_1 = 8 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ и $I_2 = 16 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. На рис. 2 приведены нормированные на F_0 кривые, полученные при интенсивно-

сти действующего света $I = 3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Кривые, полученные с добавлением DCMU, анализировали с помощью комбинированной модели (4), кривые, полученные без добавления DCMU, анализировали с помощью JIP-теста.

При анализе кривых с помощью модели мы исходили из предположения, что различия между альфа- и бета-центрами ограничиваются только эффективностью светосбора, и, как следствие, константами скоростей светозависимого образования возбужденных состояний пигмента реакционного центра в реакции $P \rightarrow P^*$ (соответственно $k_{\alpha\alpha}$ и $k_{\alpha\beta}$), тогда как остальные константы скоростей всех реакций переноса электрона одинаковы. С помощью программы DBSolve [35] была проведена идентификация параметров этой модели для описанных выше наборов данных, каждый из которых включал несколько индукционных кривых, зарегистрированных для одной и той же пробы культуры микроводорослей при пяти различных интенсивностях действующего света (см. раздел «Материалы и методы»). Для аппроксимации были выбраны следующие параметры редуцированной модели, представляющие собой сочетания элементарных констант исходной детальной модели [30]:

- $k_{\alpha\alpha}$, $k_{\alpha\beta}$ – константы, характеризующие скорости светозависимого образования возбужденных состояний пигмента реакционного центра для альфа- и бета-центров;
- k_y – константа, характеризующая скорость перехода КВК из состояния S_1 в состояние S_2 ;
- K_{pred} – константа равновесия в реакции переноса электрона от тирозина на P_{680} ;
- α – доля альфа-центров;
- s – доля активных КВК;
- F_{0f} – отношение минимального уровня флуоресценции к максимальному в комбинированной модели.

Для каждого набора данных, полученного для одной пробы, идентификацию параметров модели проводили по пяти экспериментальным кривым, зарегистрированным при разной интенсивности действующего света. Таким образом, была обеспечена единственность наборов найденных параметров. Результаты аппроксимации приведены на рис. 3. Значения параметров, полученные в результате аппроксимации, представлены в табл. 1.

Анализ формы кривых в пакете ruPhotoSyn с помощью мультиэкспоненциальной аппроксимации показал, что на всех кривых, полученных после добавления DCMU, можно выделить три в разной степени выраженные фазы (см. пример на рис. 4). Нарастание интенсивности флуоресценции содержит две фазы экспоненциального

роста с разными характерными временами и разными амплитудами. Сигмоидальность начального участка кривой, на котором интенсивность флуоресценции нарастает медленнее, чем по экспоненте, может быть связана с дополнительной экспоненциальной фазой с характерным временем порядка десятков микросекунд и отрицательной амплитудой.

Предложенная математическая модель позволяет не только выделить на кривой экспоненциальные фазы, но и дать интерпретацию каждой из них. Более выраженная сигмоидальность начальной фазы (фаза с амплитудой A_1) кривой в рамках нашей модели отражает наличие большого числа активных КВК, сама фаза соответствует переносу электрона от КВК. Амплитуда этой фазы зависит как от доли активных КВК, так и от интенсивности действующего света при измерении индукционных кривых: она практически незаметна при низкой интенсивности света и растет с ее увеличением, а также с уменьшением доли неактивных КВК. Характерное время этой фазы не зависит от интенсивности действующего света.

Вторая и третья фазы отвечают за рост интенсивности флуоресценции и связаны с реакционными центрами с различным размером светособирающей антенны. Фаза с амплитудой A_2 имеет более короткое характерное время и соответствует ФСII α , фаза с амплитудой A_3 соответствует ФСII β . Характерные времена этих фаз соотносятся с размерами антенны альфа- и бета-центров соответственно. Изменение формы начального участка характеризует изменение активности КВК, тогда как изменение соотношения амплитуд двух других фаз характеризует изменение в соотношении альфа- и бета-центров. Идентификация параметров модели по экспериментальным точкам позволила оценить эти изменения количественно (табл. 1).

Нужно отметить, что в определенных условиях, например, при очень высоких интенсивностях действующего света, когда характерное время фазы, связанной с переносом электронов от КВК, становится больше характерного времени фазы, связанной с разделением зарядов в альфа-центрах, амплитуды всех трех фаз могут оказаться положительными. В этом случае связанную с КВК фазу можно ошибочно соотнести с еще одним типом реакционных центров ФСII. Чтобы избежать такой ошибки, необходимо проводить эксперименты при нескольких интенсивностях действующего света. Если фаза характеризует один из типов реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ), характерное время этой фазы будет меняться обратно пропорционально интенсивности действующего света. Если же фаза характеризует перенос электронов от КВК, ее ха-

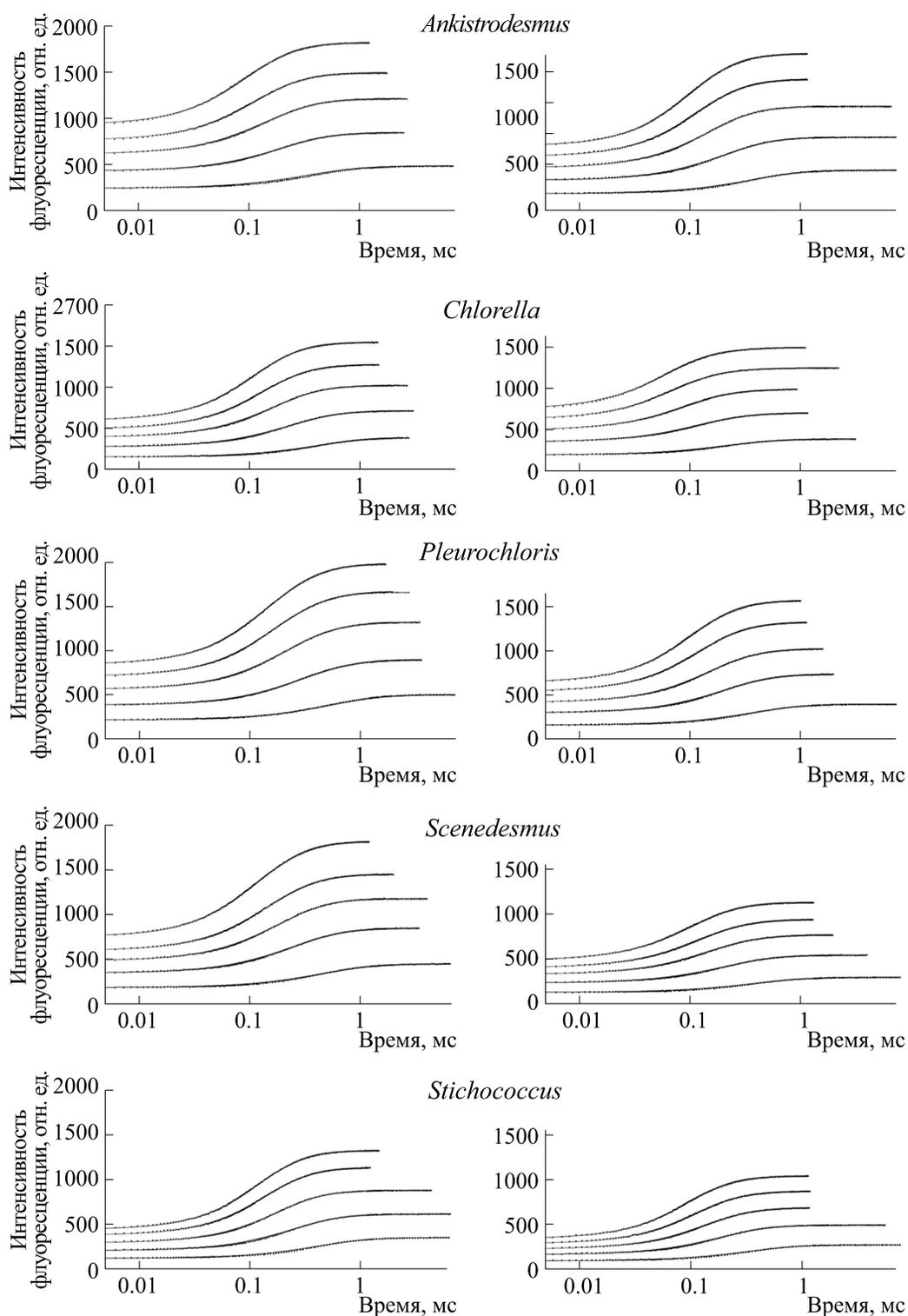


Рис. 3. Решения модели (линии), соответствующие экспериментальным кривым (точки) индукции флуоресценции, полученным при 5 интенсивностях действующего света. Расположение и цвет кривых (снизу вверх) соответствуют интенсивностям $I_1 = 1840 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (черная), $I_2 = 3440 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (синяя), $I_3 = 4900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (красная), $I_4 = 6230 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (зеленая), $I_5 = 7500 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (лиловая). Каждую из культур выращивали при постоянном освещении: левый ряд графиков – 8 Вт/м^2 ($35 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), правый ряд графиков – 16 Вт/м^2 ($70 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Таблица 1. Параметры модели, полученные при аппроксимации экспериментальных кривых, и параметры JIP-теста

	<i>Ankistrodesmus</i>		<i>Chlorella</i>		<i>Pleurochloris</i>		<i>Scenedesmus</i>		<i>Stichococcus</i>	
	$I = 8 \text{ Вт/м}^2$ (35 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 16 \text{ Вт/м}^2$ (70 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 8 \text{ Вт/м}^2$ (35 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 16 \text{ Вт/м}^2$ (70 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 8 \text{ Вт/м}^2$ (35 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 16 \text{ Вт/м}^2$ (70 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 8 \text{ Вт/м}^2$ (35 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 16 \text{ Вт/м}^2$ (70 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 8 \text{ Вт/м}^2$ (35 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	$I = 16 \text{ Вт/м}^2$ (70 мкЭ $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)
$k_{\text{х}\alpha}$, мс^{-1}	2.90 ± 0.02	2.77 ± 0.3	2.52 ± 0.03	4.61 ± 0.05	2.02 ± 0.03	2.74 ± 0.02	2.14 ± 0.02	2.73 ± 0.02	2.16 ± 0.02	2.99 ± 0.03
$k_{\text{х}\beta}$, мс^{-1}	0.70 ± 0.05		0.85 ± 0.06		0.68 ± 0.03		0.52 ± 0.05		0.36 ± 0.03	
α	0.72 ± 0.01	0.74 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.73 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.66 ± 0.02
s	0.26 ± 0.01	0.93 ± 0.04	0.85 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.79 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.83 ± 0.03	0.76 ± 0.03
k_{y} , мс^{-1}	41.03 ± 1.29		35.25 ± 1.07		28.23 ± 0.66		33.58 ± 1.43		32.12 ± 0.93	
K_{pred}^{**}	1.52		1.46		1.83		1.88		1.17	
$F_{\text{от}}$	0.35*	0.4*	0.36*	0.33*	0.39*	0.37*	0.34*	0.32*	0.3*	0.27*
V_j	0.63*	0.59*	0.65 ± 0.01	0.81*	0.55*	0.62 ± 0.02	0.57*	0.58*	0.58 ± 0.02	0.60*
PI	0.15*	0.48*	0.47 ± 0.03	0.05*	0.57 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.64 ± 0.02	0.52*	0.66 ± 0.11	0.65*
F_v/F_m	0.58*	0.71*	0.71*	0.59*	0.67*	0.69*	0.71*	0.73*	0.76*	0.78*

Примечание. Приведены средние значения и стандартная ошибка. * – Стандартная ошибка < 0.01; ** – параметр K_{pred} был зафиксирован в ходе определения стандартных отклонений параметров, поскольку была обнаружена большая корреляция между ним и параметром k_{y} .

рактерное время при изменении интенсивности действующего света не должно изменяться.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование математической модели и параметров JIP-теста позволило получить комплексную оценку гетерогенности реакционных центров ФСII для пяти различных видов водорослей (*Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Pleurochloris*, *Scenedesmus*, *Stichococcus*), каждую из которых выращивали в двух разных световых условиях. Несмотря на то, что ФСII является довольно консервативным пигмент-белковым комплексом, гетерогенность ФСII проявляется и у всех видов водорослей, выращенных в одинаковых световых условиях, и у одного вида водоросли, выращенного в разных световых условиях (табл. 1). Известно, что оптимальные значения освещенности для разных видов водорослей варьируют в широких пределах. В зависимости от предпочтений условий роста водоросли, как и высшие растения, можно разделить на светолюбивые и теневыносливые. Светолюбивые водоросли нуждаются в большом коли-

честве света для нормального роста и фотосинтеза. Это, в основном, синезеленые и многие зеленые водоросли, которые обильно растут в летнее время в верхних слоях воды. Теневыносливые водоросли, напротив, приспособлены к условиям низкой освещенности и избегают яркого света. Используемые для анализа в данной работе водоросли являются лабораторными культурами, содержащимися в одинаковых световых условиях. В естественных условиях эти виды водорослей могут входить в состав планктона прудов и озер. Предпочтение тех или иных световых условий при схожести фотосинтетического аппарата, возможно, определяется физиологией этих организмов, сложившейся в процессе эволюции. Индексы PI (индекс производительности) и F_v/F_m (квантовый выход первичной фотохимии) показывают, что для *Ankistrodesmus* более предпочтителен высокий свет, для *Chlorella* – более низкий свет, тогда как остальные (*Pleurochloris*, *Scenedesmus*, *Stichococcus*) почти безразличны к световым условиям их культивирования.

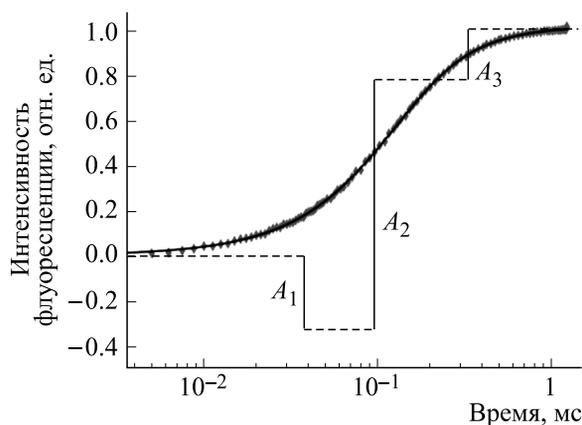


Рис. 4. Разложение кривой индукции флуоресценции, полученной для *Chlorella*, выращенной при $8 \text{ Вт м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ($35 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), на три экспоненциальные фазы (сумма трех функций вида: $A_i (1 - \exp(-t/t_i))$) в пакете ruPhotoSyn методом наименьших квадратов: начальная – отрицательная ($A_1 < 0$), и две положительные, основная, A_2 , соответствующая альфа-центрам, и дополнительная с меньшей амплитудой, A_3 , соответствующая бета-центрам. Визуализация разложения в виде ступенчатой кривой получена методом, описанным в [32].

Эффективное сечение поглощения светособирающей антенны у альфа-центров, характеризуемое параметром модели k_x , у всех видов, кроме *Ankistrodesmus*, на более высоком свету роста увеличивается (у *Chlorella* значительней, чем у других), у *Ankistrodesmus* немного уменьшается. В целом это коррелирует с предпочтительностью в свете по параметрам PI и F_v/F_m . Изменение доли альфа- и бета-центров, также как и параметр k_x , отражает изменения в светосборе ФСII. Анализ изменения доли альфа- и бета-центров показывает, что у *Chlorella* и *Stichococcus* доля альфа-центров падает на 8–10% при росте на более высоком свету, тогда как у *Pleurochloris*, наоборот, возрастает, а у *Ankistrodesmus* и *Scenedesmus* практически не меняется. Можно предположить, что отмеченное ранее увеличение эффективного сечения светособирающей антенны при действии неблагоприятных факторов среды [33] может быть связано с уменьшением доли бета-центров при снижении скорости роста культуры.

Изменения в акцепторной части характеризуются параметром V_j (доля Q_B -невосстанавливающих центров). Анализ показывает, что наибольшее увеличение доли Q_B -невосстанавливающих центров (на ~15% при росте на высоком свету) характерно для *Chlorella*, менее значительное (на ~7%) для *Pleurochloris*, практически не меняется у *Scenedesmus* и *Stichococcus*, и немного падает (на ~4%) у *Ankistrodesmus*. Видно, что изменение доли Q_B -невосстанавливающих центров, как и эффективное сечение антенны, коррелирует с предпочтительностью световых условий роста по PI и F_v/F_m .

Изменения в показателях, связанных со светосбором, интуитивно ожидаемы. Несколько не-

ожиданными оказались изменения активности кислород-выделяющего комплекса в зависимости от световых условий роста. Доля активных КВК (параметр s в модели) при росте на более высоком свету значительно меняется у *Chlorella* (уменьшается на ~60%) и у *Ankistrodesmus* (увеличивается на ~65%), менее значительно – у *Scenedesmus* и *Stichococcus*, и практически не меняется у *Pleurochloris*. Как указывалось выше, изменение активности КВК может быть связано со стадиями сборки или деградации РЦ ФСII [1, 2] в процессе роста культуры. Увеличение интенсивности света ускоряет фотоповреждение РЦ. Синтез белков и, соответственно, процессы репарации поврежденных центров, как и рост культуры в целом, также ускоряются при увеличении интенсивности света до некоторого предела. В связи с этим, в зависимости от того, являются ли организмы светолюбивыми или теневыносливыми, при одинаковом изменении интенсивности света доля РЦ с неактивным КВК может у одних видов увеличиваться, а у других – уменьшаться. При изменении интенсивности света могут также включаться специфичные механизмы ответа на стресс. Так, в работе [39] обсуждается физиологическая роль цитохрома b_{559} , входящего в состав ФСII, в регуляции сборки или деградации РЦ и, в частности, марганцевого кластера КВК при разных интенсивностях света.

Суммируя в комплексе изменения всех показателей, можно предположить, что среди исследуемых водорослей наиболее чувствительными к свету при выращивании оказались *Ankistrodesmus* и *Chlorella*. Более высокий свет предпочтительней для *Ankistrodesmus* и менее высокий для *Chlorella*, при этом у *Ankistrodesmus* на менее благоприятном свету ухудшаются показатели только донорной части ФСII – активность кислород-выделяющего

комплекса, тогда как у *Chlorella* ухудшаются показатели и донорной, и акцепторной частей, а также светособирающей антенны.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что приведенные оценки не претендуют на окончательный вывод по работе фотосинтетического аппарата исследованных водорослей в различных световых условиях роста. Скорее это пример комплексного использования простой модели и JР-теста для возможности всестороннего анализа эффективности работы ФСII и ее отдельных частей в различных условиях роста.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-11-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terentyev V. V., Shukshina A. K., Ashikhmin A. A., Tikhonov K. G., and Shitov A. V. The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life*, **10** (5), 63 (2020). DOI: 10.3390/life10050063
2. Terentyev V. V., Shukshina A. K., and Shitov A. V. Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH. *Biochim. Biophys. Acta—Bioenergetics*, **1860**, 582–590 (2019). DOI: 10.1016/j.bbabi.2019.06.003
3. Melis A. and Homann P. H. Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **21**, 431–437 (1975). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06701.x
4. Melis A. and Homann P. H. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **23** (5), 343–350 (1976). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1976.tb07259.x
5. Malkin S. and Kok B. Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I-Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochim. Biophys. Acta*, **126** (3), 413–432 (1966). DOI: 10.1016/0926-6585(66)90001-x
6. Murata N., Nishimura M., and Takamiya A. Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. II. Induction of fluorescence in isolated spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **120** (1), 23–33 (1966). DOI: 10.1016/0926-6585(66)90273-1
7. Hsu B.D., Lee Y.S., and Jang Y.R. A method for analysis of fluorescence induction curve from DCMU-poisoned chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **975** (1), 44–49 (1989). DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80199-9
8. Hsu B.D. and Lee J.Y. A study on the fluorescence induction curve of the DCMU-poisoned chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1056** (3), 285–292 (1991). DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80060-X
9. Umena Y., Kawakami K., Shen J. R., and Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, **473** (7345), 55–60 (2011). DOI: 10.1038/nature09913
10. Van Bezouwen L. S., Caffarri S., Kale R. S., Kouřil R., Thunnissen A.-M. W. H., Oostergetel G. T., and Boekema E. J. Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nat. Plants*, **3** (7), 17080 (2017). DOI: 10.1038/nplants.2017.80
11. Hsu B. D. and Lee J. Y. The photosystem II heterogeneity of chlorophyll *b*-deficient mutants of rice: a fluorescence induction study. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22** (2), 195–200 (1995). DOI: 10.1071/PP9950195
12. Mathur S., Allakhverdiev S. I., and Jajoo A. Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of photosystem II in wheat (*Triticum aestivum*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1807** (1), 22–29 (2011). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.09.001
13. Anderson J. M. and Melis A. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** (3), 745–749 (1983). DOI: 10.1073/pnas.80.3.745
14. Joliot A. and Joliot P. Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **258**, 4622–4625 (1964).
15. Sipka G., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J. R., Lambrev P. H., and Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell*, **33**, 1286–1302 (2021). DOI: 10.1093/plcell/koab008
16. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1058** (2), 87–106 (1991). DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80225-7
17. Pan X. L., Deng C. N., Zhang D. Y., Wang J. L., Mu G. J., and Chen Y. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquat. Toxicol.*, **89** (4), 207–213 (2008). DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.06.018
18. Singh-Tomar R., Mathur S., Allakhverdiev S. I., and Jajoo A. Changes in PS II heterogeneity in response to osmotic and ionic stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44** (4), 411–419 (2012). DOI: 10.1007/s10863-012-9444-1

19. Dao L. H. T. and Beardall J. Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity. *Algal Res.*, **16**, 150–159 (2016). DOI: 10.1016/j.algal.2016.03.006
20. Markou G., Dao L. H. T., Muylaert K., and Beardall J. Influence of different degrees of N limitation on photosystem II performance and heterogeneity of *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.*, **26**, 84–92 (2017). DOI: 10.1016/j.algal.2017.07.005
21. Antal T., Mattila H., Hakala-Yatkin M., Tyystjarvi T., and Tyystjarvi E. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, **232** (4), 887–898 (2010). DOI: 10.1007/s00425-010-1227-5
22. McCauley S. W. and Melis A. Quantitation of photosystem II in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **849** (2), 175–182 (1986). DOI: 10.1016/0005-2728(86)90023-x
23. Malkin S., Armond P. A., Mooney H. A., and Fork D. C. Photosystem II photosynthetic unit sizes from fluorescence induction in leaves: correlation to photosynthetic capacity. *Plant Physiol.*, **67** (3), 570–579 (1981). DOI: 10.1104/pp.67.3.570
24. Henrysson T. and Sundby C. Characterization of photosystem II in stroma thylakoid membranes. *Photosynth. Res.*, **25** (2), 107–117 (1990). DOI: 10.1007/bf00035459
25. Wang, R. T. and Myers, J. Energy transfer between photosynthetic units analyzed by flash oxygen yield vs. flash intensity. *Photochem. Photobiol.*, **17** (5), 321–332 (1973). DOI: 10.1111/J.1751-1097.1973.Tb06360.X
26. Nedbal L., Gibas C., and Whitmarsh J. Light saturation curves show competence of the water splitting complex in inactive Photosystem II reaction centers. *Photosynth. Res.*, **30** (2–3), 85–94 (1991). DOI: 10.1007/bf00042006
27. Lazar D., Tomek P., Ilik P., and Nauš J. Determination of the antenna heterogeneity of Photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosynth. Res.*, **68** (3), 247–257 (2001). DOI: 10.1023/A:1012973402023
28. Kalaji H. M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V. K., Misra A. N., Nebauer S. G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yanniccari M., Zivcak M., Cetner M. D., Samborska I. A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., and Baba W. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth. Res.*, **132** (1), 13–66 (2016). DOI: 10.1007/s11120-016-0318-y
29. de Marchin T., Ghysels B., Nicolay S., and Franck F. Analysis of PSII antenna size heterogeneity of *Chlamydomonas reinhardtii* during state transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1837** (1), 121–130 (2014). DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.07.009
30. Plyusnina T. Yu., Khruschev S. S., Degtereva N. S., Voronova E. N., Volgusheva A. A., Riznichenko G. Yu., and Rubin A. B. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity. *Photosynth. Res.*, **159**, 303–320 (2024). DOI: 10.1007/s11120-024-01077-7
31. Погосян С. И., Гальчук С. В., Казимирко Ю. В., Конюхов И. В. и Рубин А. Б. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. *Вода: химия и экология*, **6**, 34–40 (2009).
32. Плюснина Т. Ю., Хрущев С. С., Ризниченко Г. Ю. и Рубин А. Б. Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации. *Биофизика*, **60** (3), 487–495 (2015).
33. Plyusnina T. Yu., Khruschev S. S., Degtereva N. S., Konyukhov I. V., Solovchenko A. E., Kouzmanova M., Goltsev V. N., Riznichenko G. Yu., and Rubin A. B. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion during microalgae cultivation in photobioreactor. *Photosynthetica*, **58** (SI), 443–451 (2020). DOI: 10.32615/ps.2020.002
34. Тихонов А. Н. О зависимости решений дифференциальных уравнений от малого параметра. *Матем. сб.*, **22** (64) N. 2, 193–204 (1948).
35. Gizzatkulov N. M., Goryanin I. I., Metelkin E. A., Mogilevskaia E. A., Peskov K. V., and Demin O. V. DBSolve Optimum: a software package for kinetic modeling which allows dynamic visualization of simulation results. *BMC Syst. Biol.*, **4**, 109 (2010). DOI: 10.1186/1752-0509-4-109
36. Newville M., Otten R., Nelson A., Stensitzki T., Ingargiola A., Allan D., Fox A., Carter F., Michał, Osborn R., Pustakhod D., Weigand S., Ineuhaus, Aristov A., Glenn, Mark, mgunyho, Deil Ch., Hansen A. L. R., Pasquevich G., Foks L., Zobrist N., Frost O., Stuermer, Jaskula J.-Ch., Caldwell Sh., Eendebak P., Pompili M., Nielsen J. H., and Persaud A. LMFIT: Non-Linear Least-Square Minimization and Curve-Fitting for Python. *Zenodo* (2023) DOI: 10.5281/zenodo.598352
37. Hunter J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Engineer.*, **9** (3), 90–95 (2007). DOI: 10.1109/MCSE.2007.55
38. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., and Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: *Chlorophyll a fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee, **19**, 321–362 (2004). DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9_12
39. Hamilton M. L., Franco E., Deák Z., Schlodder, E., Vass I., and Nixon P. J. Investigating the photoprotective role of cytochrome *b-559* in Photosystem II in a Mutant with altered ligation of the haem. *Plant Cell Physiol.*, **55** (7), 1276–1285 (2014). DOI: 10.1093/pcp/pcu070

Assessment of Antenna Heterogeneity and Activity of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II Using Mathematical Methods

N.S. Degtereva*, T.Yu. Plyusnina*, S.S. Khrushchev*, R.N. Chervitsov*, E.N. Voronova*, O.V. Yakovleva*, T.K. Antal**, G.Yu. Riznichenko*, and A.B. Rubin*

*Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University, Sovetskaya ul. 21, Pskov, 180000, Russia

Photosystem II is one of the main pigment-protein complexes of photosynthesis, which is highly sensitive to unfavorable environmental factors. Heterogeneity of properties in photosystem II is a key factor for the resistance of autotrophic organisms to stress factors. Assessment of the photosystem II heterogeneity can be used in environmental monitoring for rapid detection of environmental pollution. The paper presents an integrated approach for assessing the heterogeneity of photosystem II, based on a mathematical analysis of the shape of the chlorophyll a fluorescence induction curve of samples treated with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea using a mathematical model and the parameters from the JIP-test. Fluorescence induction curves obtained for treated samples from *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Pleurochloris*, and *Stichococcus* cell cultures grown under 8 and 16 W·m⁻² of light intensities were analyzed. For all cases, the relationship between reaction centers and different antenna sizes (alpha and beta centers) was assessed, and the part of active and inactive oxygen-releasing complexes was determined.

Keywords: photosystem II, mathematical model, heterogeneity of the reaction center

УДК 577.344

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ ДАЛЬНЕГО КРАСНОГО СВЕТА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ I ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Acaryochloris marina*

© 2024 г. А.А. Петрова^{*,*}, А.Р. Casazza^{**}, S. Santabarbara^{**}, Д.А. Черепанов^{*,***}

^{*}НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/40, Москва, 119992, Россия

^{**}Photosynthesis Research Unit, National Research Council of Italy, Via A. Corti 12, Milano, 20133 Italy

^{***}Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

[#]E-mail: draparnaldia@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2024 г.

После доработки 08.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Преобразование энергии света ближнего инфракрасного спектрального диапазона фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами интенсивно исследуется в последние годы в связи с открытием цианобактерий, в фотосинтетическом аппарате которых присутствуют поглощающие длинноволновый свет хлорофиллы *f* и *d*. Особое место в ряду таких цианобактерий занимает *Acaryochloris marina*. Ее фотосистема I содержит преимущественно хлорофилл *d*, он входит в состав специальной пары P₇₄₀. спектр поглощения которой сдвинут в красную область на 40 нм. Это обуславливает снижение энергии возбужденного состояния P₇₄₀ на ~0.1 эВ по сравнению с содержащей хлорофилл *a* фотосистемой I. Комплексы фотосистемы I из *A. marina* имеют и другие особенности: четыре молекулы хлорофилла *a* реакционного центра заменены на хлорофилл *d*, а третья пара молекул хлорофилла *a*, участвующих в переносе электрона, — на феофитин *a*. Наличие спектрально различающихся кофакторов (хлорофилла *d* и феофитина *a*) позволило надежно установить интермедиаты первичных реакций разделения зарядов в данной фотосистеме I. В настоящем обзоре мы рассмотрим последние результаты изучения фотохимического преобразования энергии в реакционных центрах фотосистемы I из *A. marina* и возможные механизмы компенсации энергетических потерь при использовании для фотосинтеза низкоэнергетического дальнего красного света.

Ключевые слова: фотосинтез, дальний красный свет, хлорофилл *d*, фотосистема I, разделение зарядов, кинетическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302924030084, EDN: OFLWPP

Ключевым компонентом фотохимического преобразования энергии солнечного света при окислительном фотосинтезе являются молекулы хлорофилла. Хлорофилл ответственен за поглощение основной части энергии, а также участвует в первичных реакциях разделения зарядов и переноса электрона. До недавнего времени считалось, что только комплексы хлорофилла *a* (Хл *a*) могут непосредственно осуществлять фотохимическое разделение зарядов в реакционном центре. Другие хлорофиллы — *b*, *c*, *d* и *f* — рассматривались

как антенные пигменты, расширяющие спектр действия фотосинтеза [1, 2]. Однако открытие цианобактерии *Acaryochloris marina*, в которой хлорофилл *d* (Хл *d*) составляет 90–99% от всего содержания хлорофиллов, поколебало это утверждение [3]. Хл *d*, как и Хл *a*, является хлорином. Заместители этих двух хлорофиллов отличаются только в С-3 положении кольца А, где винильная группа Хл *a* заменена на более полярную формильную группу в Хл *d* (рис. 1). Наличие кетонного атома кислорода в системе сопряженных π-связей приводит к смещению электронной плотности хлоринового кольца, поэтому полоса Q_Y в случае Хл *d* сдвинута в красную область до 697 нм по сравнению с 665 нм Хл *a* (рис. 1) [5].

Сокращения: Хл *a* — хлорофилл *a*; Хл *d* — хлорофилл *d*; ФС I — фотосистема I; ФС II — фотосистема II; ФС I-Хл *a* — фотосистема I, содержащая хлорофилл *a*; ФС I-Хл *d* — фотосистема I, содержащая хлорофилл *d*; реакционный центр — PC; Фео *a* — феофитин *a*.

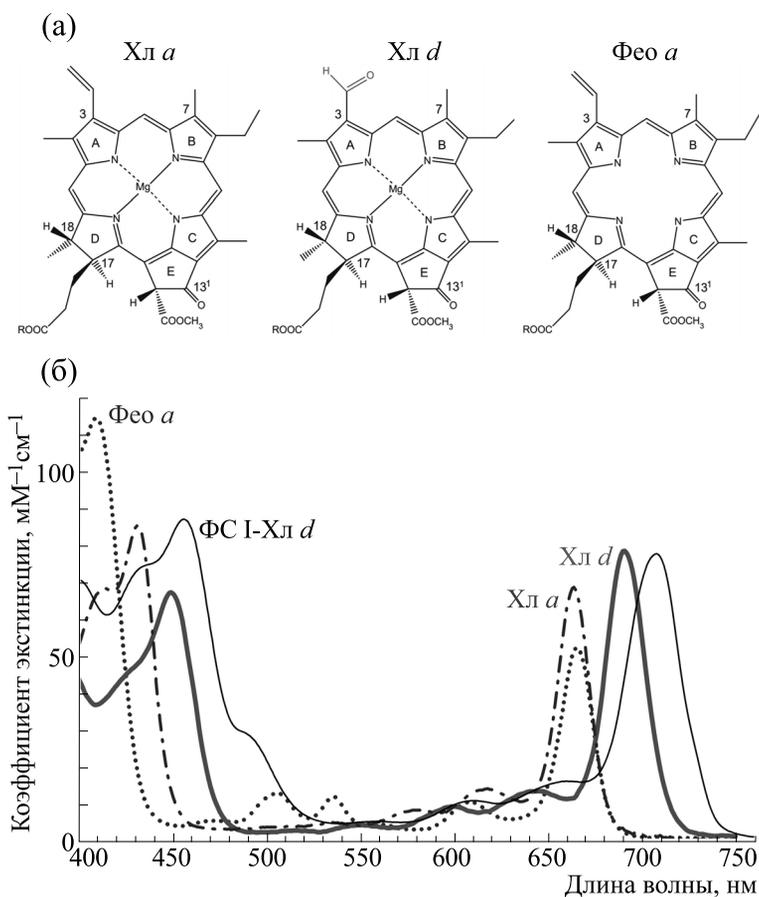


Рис. 1. Химические структуры хлорофилов (а) и их спектры поглощения в диэтиловом эфире (б). Положение полосы Q_y , соответствующей переходу $S_0 \rightarrow S_1$, практически идентично в молекулах хлорофилла *a* и феофитина *a*. Появление электроотрицательной формильной группы в кольце А молекулы хлорофилла *d* приводит к сдвигу всего спектра поглощения в красную область. Взаимодействие Хл *d* с белковым окружением фотосистемы I усиливает красный сдвиг спектра поглощения Хл *d*. Спектр Хл *d* приводится по работе [4].

В электрон-транспортной цепи *A. marina* обе фотосистемы, фотосистема 1 (ФС I) и фотосистема 2 (ФС II) содержат преимущественно Хл *d*. Функции фотосистем в этой необычной цианобактерии, в основном, такие же, как и в содержащих Хл *a* кислород-выделяющих организмах. Благодаря совместной работе ФС II и ФС I энергия солнечного света используется для осуществления окислительно-восстановительных реакций и установления протонного градиента на тилакоидной мембране. Итогом последовательности светозависимых реакций является окисление воды на донорном конце цепи и восстановление низкопотенциального акцептора электрона (ферредоксина) на акцепторном конце. На донорной стороне ФС II создает высокий окислительный потенциал (> 1 В против нормального водородного электрода), в то время как на акцепторной стороне в ФС I образуется сильный восстановитель с потенциалом ниже -1 В (рис. 2а) [6–8]. Таким образом, разность потенциалов на концах электрон-транспортной цепи превышает 2 В.

Светозависимое разделение зарядов в димере хлорофилла $[Хл-Хл]^* \rightarrow [Хл^+Хл^-]$ позволяет создавать разность потенциалов не более 1.7 В, поэтому в ФС I и ФС II осуществляется противоположная по знаку адаптация редокс-свойств молекулы хлорофилла за счет их взаимодействия с белковым окружением.

В ФС I, содержащей Хл *a* (ФС I-Хл *a*), в процессе превращения энергии из световой формы в химическую можно выделить следующие этапы: 1) поглощение света и перенос энергии возбуждения на реакционный центр (РЦ), 2) первичное разделение и стабилизация зарядов в РЦ, 3) перенос электрона и восстановление внешнего акцептора, 4) восстановление фотоокисленного донора электронов. Каждый этап осуществляет особый набор кофакторов (рис. 2б).

За поглощение и перенос энергии в реакционный центр в ФС I растений, водорослей и большинства цианобактерий отвечает внутренняя антенна из 90 молекул Хл *a* и 22 молекул β -кароти-

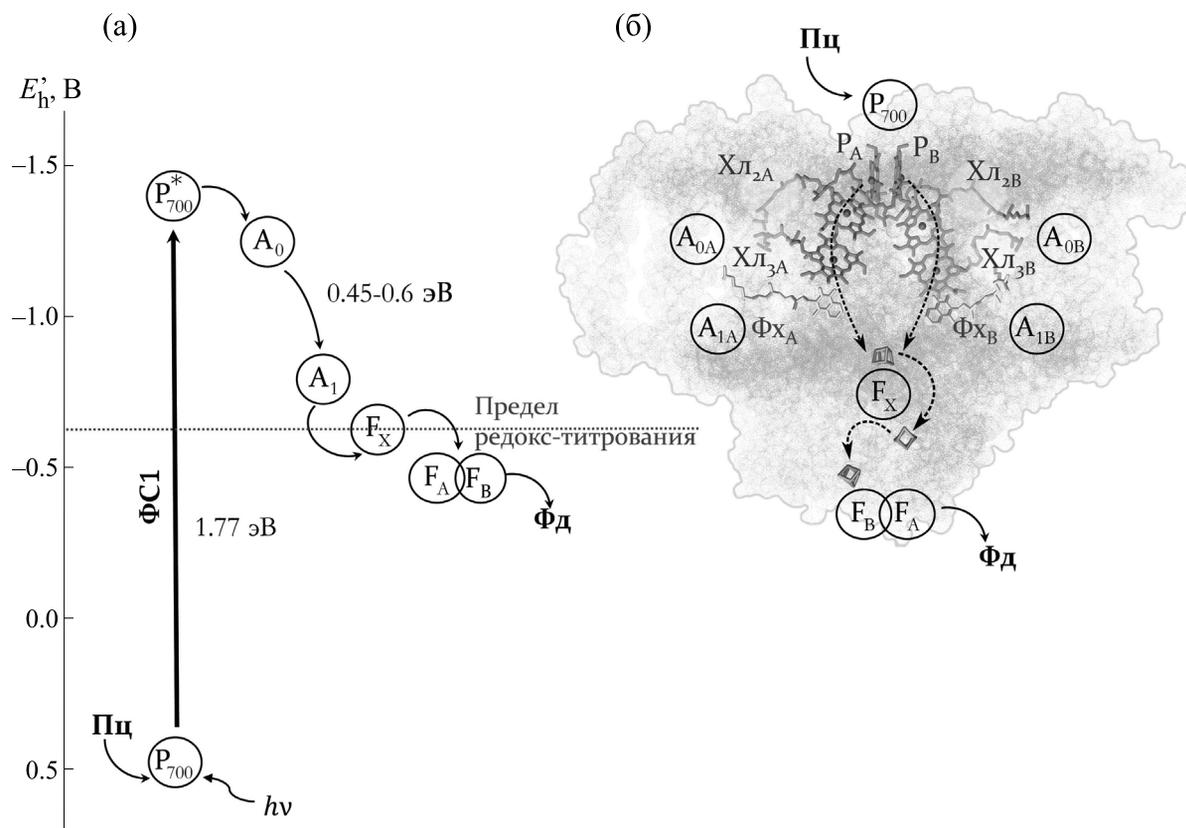


Рис. 2. Механизм фотосинтетического преобразования энергии (а) и молекулярная организация кофакторов реакционного центра и электрон-транспортной цепи (б) в содержащей хлорофилл *a* фотосистеме I. Перенос электрона по цепи кофакторов в ФС I-Хл *a* происходит по градиенту окислительно-восстановительного потенциала (E_0'). Около половины энергии кванта, поглощенного реакционным центром, расходуется на стабилизацию образовавшихся ион-радикальных пар. Значения E_0' для кофакторов A_0 и A_1 приведены условно, так как они лежат ниже предела окислительно-восстановительного титрования. В качестве экзогенного растворимого акцептора электрона на рисунке приведен ферредоксин (Фд), в качестве внешнего донора – пластокиноин (Пц), как универсальный акцептор и донор для цианобактерий, водорослей и высших растений. В качестве примера строения ФС I-Хл *a* использована структура ФС I цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* [9].

на. В ряде организмов она включает экситонно-сопряженные димеры и тримеры Хл *a* или молекулы хлорофилла *f*, которые выступают как ловушки в низкоэнергетической (красной) области спектра [10–12]. Значительный размер антенны и присутствие низкоэнергетических ловушек представляют трудности для анализа процессов переноса энергии в ФС I-Хл *a*, в настоящий момент для их описания на основе кристаллографической структуры ФС I-Хл *a* из цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* предложено несколько теоретических моделей [13–16].

В первичном разделении зарядов и последующей стабилизации ион-радикальной пары участвуют 6 молекул Хл *a* реакционного центра, среди которых можно выделить три димера. Специальная пара P_{700} представляет собой практически симметричный димер $P_A P_B$, расположенный на

центральной оси C_2 -симметрии комплекса, два димера, состоящие из молекул Хл₂ и Хл₃ (иначе они обозначаются eC_2 и eC_3), находятся по обе стороны от P_{700} . Димеры Хл_{2A}-Хл_{3A} и Хл_{2B}-Хл_{3B} традиционно обозначают как A_{0A} и A_{0B} . Вместе с молекулами филлохинона A_{1A} и A_{1B} они образуют две симметричные ветви переноса электрона. В отличие от бактериального РЦ и ФС II, обе ветви участвуют в окислительно-восстановительных реакциях.

Молекулярная природа первичных ион-радикальных пар, соответствующие кинетические (константы скорости реакций $k_{\pm 1}$, $k_{\pm 2}$) и термодинамические (изменение свободной энергии реакций ΔG_1 , ΔG_2) параметры электронных переходов между шестью молекулами Хл *a* реакционного центра до сих пор являются предметом

дискуссии. Две различные модели, описывающие разделение и стабилизацию зарядов, показаны на схеме 1 [17] и будут обсуждаться ниже. Следует

считать эту схему упрощенной, поскольку она не учитывает взаимодействие ветвей в процессе переноса электрона [18–21].

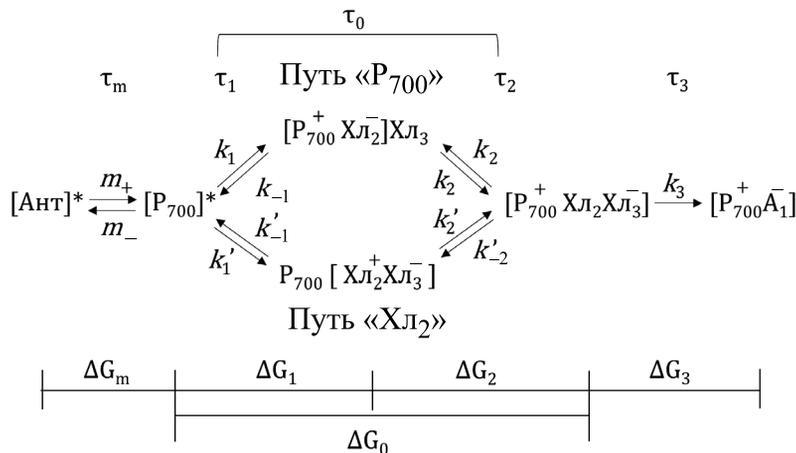


Схема 1. Последовательность фотохимических реакций в комплексах ФС I-Xл a. Возбужденные состояния пигментов антенны представлены блоком [Ant]*, возбужденные состояния шести экситонно-сопряженных пигментов реакционного центра – блоком [P₇₀₀]*, а возможные состояния шести молекул Xл a реакционного центра с разделенными зарядами – блоками [P₇₀₀⁺Xл₂⁻], [Xл₂⁺Xл₃⁻], [P₇₀₀⁺Xл₃⁻] и [P₇₀₀⁺A₁⁻].

Достоверно показано, что разделение зарядов приводит к образованию пары P₇₀₀⁺Xл₃⁻ и к переносу электрона на филлохинон с образованием пары P₇₀₀⁺A₁⁻. Константа скорости восстановления филлохинона k₃ оценивается в диапазоне 25–40 нс⁻¹ [17, 22–25].

Дальнейшие реакции переноса электрона включают восстановление железо-серного кластера F_X, где сходятся две ветви переноса электрона. Железо-серные кластеры F_A и F_B образуют акцепторную сторону комплекса ФС I-Xл a, которая обеспечивает эффективное восстановление экзогенных акцепторов электронов [26, 27], а P₇₀₀⁺, в свою очередь, восстанавливается от экзогенного донора электронов – пластоцианина либо цитохрома c₆.

Xл a долгое время считался неотъемлемым компонентом РЦ выделяющих кислород фотосинтезирующих организмов. Открытие *A. marina* поставило вопрос, возможна ли генерация в фотосинтетической электрон-транспортной цепи с участием Xл d необходимого восстановительного потенциала [28].

В данном обзоре мы остановимся на описании молекулярных механизмов реакций разделения и стабилизации зарядов в реакционном центре ФС I из *A. marina* (ФС I-Xл d). Мы рассмотрим необычный состав кофакторов ФС I-Xл d, сопоставим кинетические и энергетические парамет-

ры первичных фотохимических реакций в комплексах ФС I-Xл d и канонической ФС I-Xл a.

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА КОФАКТОРОВ И КИНЕТИКА ПЕРВИЧНЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ ФОТОСИСТЕМЫ I ИЗ *A. marina*

Хроматографический анализ клеток и выделенных комплексов ФС I из *A. marina* показал, что помимо Xл d в них присутствуют небольшие количества других пигментов: Xл a и феофитина a (Фео a) [29–31]. По этой причине исследователи не исключали, что Xл a и Фео a составляют каталитический центр фотохимических реакций в ФС I и ФС II в *A. marina*, в то время как Xл d является антенным пигментом [32].

Однако микросекундные дифференциальные спектры в диапазоне 400–850 нм в ответ на возбуждающую лазерную вспышку с длиной волны 532 нм показали две основные полосы выцветания с максимумами 455 и 740 нм, поэтому первичный донор электронов в этой ФС I был назван P₇₄₀ [29]. Спектр поглощения специальной пары в ФС I-Xл d оказался сдвинут на 40 нм в красную сторону относительно P₇₀₀ в ФС I-Xл a. Возник вопрос, чем обусловлен этот сдвиг: молекулярной природой хлорофилла или белковым окружением? P₇₄₀ мог быть как димером Xл a, так и димером Xл d [29]. Окончательный выбор в пользу

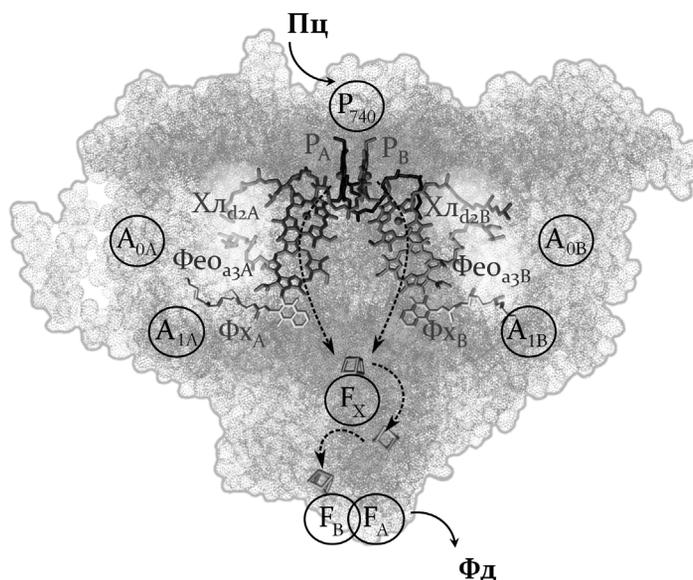


Рис. 3. Молекулярная организация кофакторов реакционного центра и электрон-транспортной цепи в содержащей преимущественно Хл *d* фотосистеме 1 из *A. marina* [35,36].

Хл *d* позволило сделать исследование выделенных комплексов ФС I методами инфракрасной и ЭПР-спектроскопии [33, 34]. Впоследствии было показано, что P_{740} , как и P_{700} , представляет собой гетеродимер Хл *d* и Хл *d'* (рис. 3) [35, 36]. Таким образом, ФС I из *A. marina* стала первой известной ФС I окисленных организмов, в которой первичный донор электронов был представлен не Хл *a*.

Труднее оказалось установить природу кофакторов A_{0A} и A_{0B} в ФС I из *A. marina*. Авторы работы [37] проследили спектральные изменения в полосе Q_Y (660–780 нм) во временном диапазоне 0.6–256 пс в ответ на неизбирательное возбуждение хлорофилла антенны лазерной вспышкой с длиной волны 630 нм. При этом спектральные изменения «закрытых» центров (т.е. комплексов с химически окисленным P_{740}) вычитали из кинетики «открытых» центров (с восстановленным P_{740}). Этот метод использовался в ранних работах с ФС I-Хл *a* для отделения абсорбционных изменений реакционного центра от спектральной динамики хлорофилла антенны [25, 38, 39].

Предполагалось, что разность переходных спектров между P_{740} в восстановленном и предокисленным состояниях будет выявлять спектры кофакторов, непосредственно участвующих в переносе электрона. Однако в случае ФС I-Хл *d* спектры переходных ион-радикальных состояний разрешались плохо (врезка на рис. 4б).

Были разрешены две компоненты с характерными временами 6–7 пс и 40–60 пс. В спектре быстрой компоненты проявилась полоса выцветания с максимумом на 680 нм. Она исчезала с характерным временем $\tau \approx 50$ пс, поэтому ее отнесли к спектру аниона первичного акцептора электрона A_0 . Сдвинутый в синюю область относительно других хлорофиллов ФС I-Хл *d* спектр поглощения указывал на то, что химически A_0 представляет собой Хл *a*, тем более, что его содержание в препаратах выделенной ФС I составило ~ 1 –2 молекулы на один комплекс [29, 30].

Однако значимых изменений в области 740 нм, относящихся к полосе специальной пары P_{740} , в быстрой компоненте не присутствовало (врезка на рис. 4б, тонкая сплошная линия). Значительное выцветание полосы с центром на 730 нм проявлялось лишь в медленной компоненте (врезка на рис. 4б, пунктирная сплошная линия). Таким образом, спектральные полосы P_{740}^+ в кинетике проявлялись позже, чем полосы предполагаемого A_0^- . Помимо полосы выцветания на 680 нм, в дифференциальном спектре быстрой компоненты наблюдалось также выцветание на длине волны 710 нм, а медленная компонента содержала сопоставимое увеличение поглощения Хл *a* в области 680 нм.

Для интерпретации полученных данных авторы работы [37] предположили, что Хл *a* в сайте eC3 является первичным акцептором электрона, а первичным донором является Chl *d* с максимумом поглощения на 710 нм в сайте eC2. Первичная реакция разделения зарядов происходит с характерным временем $\tau_1 = 6$ –7 пс. Последующий перенос электрона на филлохинон A_1 кинетиче-

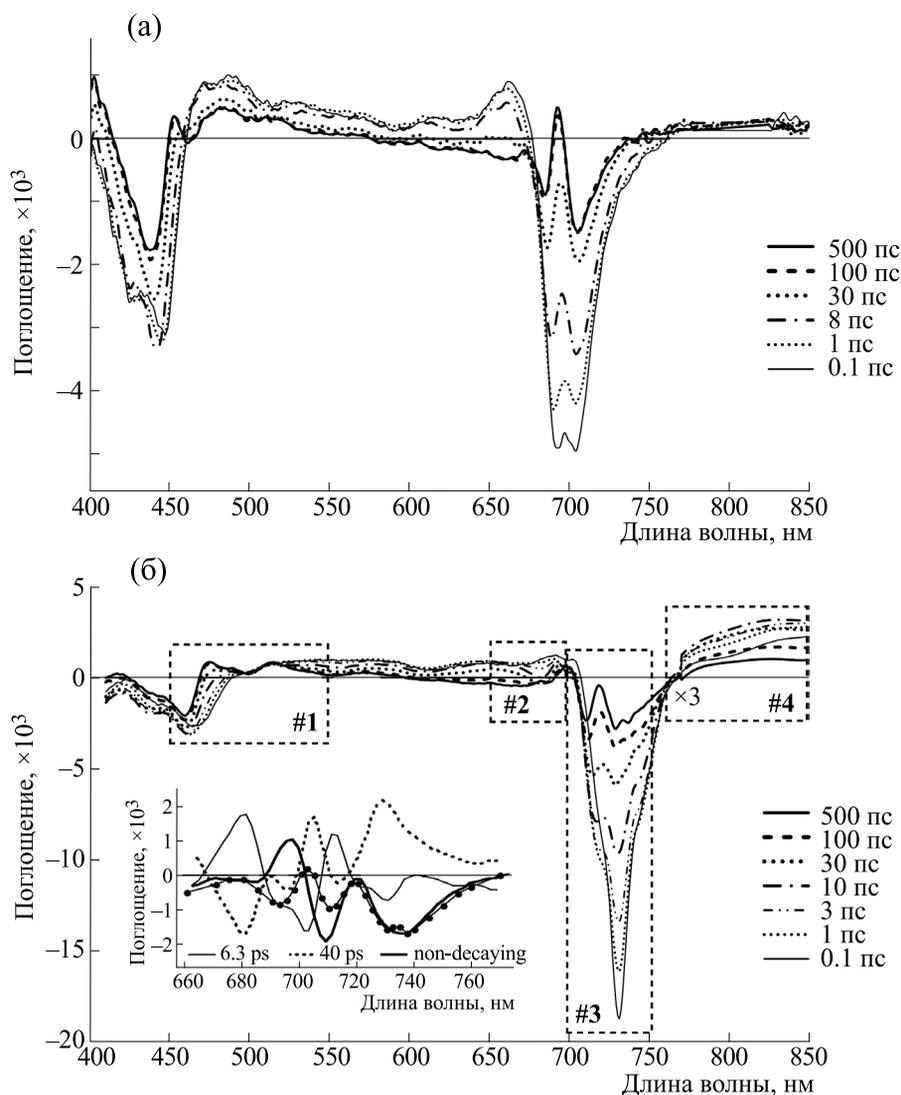


Рис. 4. Переходные спектры ФС I-Xл *a* из *Synechocystis* 6803 (а) при возбуждении на длине волны 720 нм и ФС I-Xл *d* из *A. marina* (б) при возбуждении на длине волны 740 нм. Временные задержки: 0,1 пс, 1 пс, 3 пс, 8-10 пс, 30 пс, 100 пс и 500 пс. Номерами отмечены спектральные области, специфически характеризующие интермедиаты в ФС I-Xл *d*. Врезка: спектры кинетических экспоненциальных компонент распада (DAS) абсорбционной динамики ФС I-Xл *d* из *A. marina*, полученные путем вычитания спектральных изменений «закрытых» комплексов из изменений «открытых» комплексов по данным работы Кумазаки с соавт. [37].

ски сопряжен с окислением P_{740} и происходит со временем $\tau_2 = 40-60$ пс. Данный механизм соответствует нижнему пути «Хл₂» на схеме 1. Позднее в работах [17, 22, 40] подобный механизм был предложен для описания фотохимических реакций в ФС I-Xл *a*. Эта модель использовалась в дальнейшем в работах [41-43]. В данном механизме первичное разделение зарядов происходит между Хл₂ и Хл₃ независимо в каждой из двух ветвей А или В, первичной ион-радикальной парой является состояние $[Хл_2^+Хл_3^-]$. Согласно данным работ [17, 22, 40], последующее окисление P_{700} в канонической ФС I происходит со време-

нем 6-8 пс, предшествуя во времени переносу электрона на филлохинон A_1 со временем 25-30 пс [22].

Альтернативный механизм, использующий аналогию с последовательностью реакций разделения зарядов в бактериальном реакционном центре, был предложен в работах [25, 44, 45]. В данном механизме первичным донором электрона является специальная пара P_{700} , а первичным акцептором - вторая молекула хлорофилла в одной из ветвей А или В (верхний путь « P_{700} » на схеме 1). Как и в бактериальном центре, последующий перенос электрона на третий кофактор (в случае бактериального РЦ - бактериофеофитин,

в случае ФС I – молекула Хл₃) происходит быстро, поэтому первым наблюдаемым состоянием с разделенными зарядами является пара $P_{700}^+Xl_3^-$, обычно обозначаемая как $P_{700}^+A_0^-$. Энергетический уровень этого состояния относительно возбужденного хлорофилла антенны в дальнейшем обозначен как $\Delta G_0 = \Delta G_1 + \Delta G_2$. Близость спектральных свойств возможных интермедиатов, возникающих в ходе фотоиндуцированного разделения зарядов в ФС I-Хл *a*, затрудняет их надежное определение.

Несмотря на то, что в ФС I-Хл *d* спектры A_0^- и P_{740}^+ оказались различимы, спектры P_{740}^+ и возбужденных состояний Хл *d* антенны перекрываются. Кроме того, на комплексах ФС I-Хл *a* было показано, что в «закрытых» и «открытых» РЦ тушение флуоресценции Хл *a* антенны происходит с одинаковой скоростью [37, 46, 47]. Столь же быстрое непроизводительное тушение возбужденного состояния наблюдалось в комплексах ФС I-Хл *a*, несущих аминокислотные замены вблизи сайта еС2 [48]. Объяснением может быть ограничение скорости фотохимических реакций кинетикой передачи энергии возбуждения от антенны к РЦ [49, 50]. В этом случае спектральные изменения кофакторов РЦ и антенны могут перекрываться также кинетически. Поэтому метод вычитания спектральных изменений в «закрытых» и «открытых» центрах, использованный в работе [37] для ФС I-Хл *d*, не позволяет выявлять быстрые электронные переходы, и последовательность фотохимических реакций осталась не вполне определенной.

В 2021 г. появилась структура ФС I из *A. marina* (PDB ID: 7COY) [35]. Она подтвердила, что P_{740} является гетеродимером Хл *d* и Хл *d'*, однако сайты связывания еС2 и еС3 в обеих ветвях оказались заняты вовсе не молекулами Хл *a*. В сайтах связывания еС2 были выявлены молекулы Хл *d* (Хл_{d2}), а в сайтах еС3 – молекулы феофитина *a* (Фео_{a3}) (рис. 3). Феофитин – обычный кофактор пигмент-белковых комплексов второго типа, таких как ФС II, однако он никогда ранее не выявлялся в пигмент-белковых комплексах первого типа, в частности в ФС I.

Наличие в ФС I-Хл *d* на ключевой позиции еС3 молекулы Фео *a*, отличающейся от всех остальных пигментов фотосистемы ФС I-Хл *d*, дает уникальную возможность установить, по какому пути – « P_{700} » (который в данном случае более корректно называть « P_{740} ») или «Хл₂» – протекают первичные реакции, а также определить их характерные времена τ_i и изменения свободной энергии ΔG_i .

Для определения интермедиатов первичных фотохимических реакций были проведены измерения абсорбционной динамики ФС I-Хл *d* методом фемтосекундной спектроскопии «возбуждение–зондирование» в широком спектральном окне 400–900 нм [51]. Длительность задержки между возбуждающей и измерительной вспышками возрастала от 0.1 до 500 пс. Избирательное возбуждение антенны ФС I-Хл *d* проводили в области 630 нм, избирательное возбуждение реакционного центра – на длине волны 740 нм. Такой экспериментальный подход позволил: 1) зарегистрировать спектральные изменения в полосе Соре и в дальней красной области спектра, где есть спектральные полосы P_{740}^+ , Хл *d*⁻ и Фео *a*⁻; 2) проследить динамику относительных вкладов P_{740}^+ и Фео_{a3}⁻ по специфическим спектральным маркерам; 3) определить, ограничивает ли перенос энергии из антенны в РЦ образование ион-радикальной пары $P_{740}^+Фео_{a3}^-$.

Ранее сходный подход применялся для изучения комплексов ФС I-Хл *a* из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [25, 52]. На рис. 4 сравниваются переходные спектры поглощения ФС I-Хл *a* из цианобактерии *Synechocystis* 6803 при возбуждении на длине волны 720 нм (рис. 4а) и аналогичные спектры ФС I-Хл *d* из *A. marina* при возбуждении на длине волны 740 нм (рис. 4б).

Особенностью абсорбционных изменений ФС I-Хл *a* из *Synechocystis* 6803 является наличие двух полос выцветания 690 и 705 нм, появляющихся уже на самых коротких временных задержках 100 фс [25], что было интерпретировано как свидетельство сверхбыстрого разделения зарядов между P_{700} и A_0 . Позднее сверхбыстрое разделение зарядов было проанализировано в рамках адиабатической модели симметричного тетрамерного эксиплекса Хл_{2A}Р_AР_BХл_{2B}, в котором возбужденное состояние (Хл_{2A}Р_AР_BХл_{2B})^{*} смешано с двумя состояниями с переносом заряда $P_{700}^+Xl_{2A}^-$ и $P_{700}^+Xl_{2B}^-$ [19, 53]. Однако спектральные изменения в области полосы Q_Y, обусловленные выцветанием и стимулированным излучением Хл *a* антенны в начальный момент времени (тонкая сплошная линия на рис. 4а), находятся в той же спектральной области, что и спектр ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ (жирная сплошная линия на рис. 4а), превышая последний в несколько раз по амплитуде, что не дает возможности однозначно интерпретировать наблюдаемую спектральную динамику.

В спектрах ФС I-Хл *d* из *A. marina* изменения поглощения Фео_{a3}⁻ (спектральный интервал #2 на рис. 4б) хорошо отделены от изменений Хл *d* антенны (спектральный интервал #3). Кроме то-

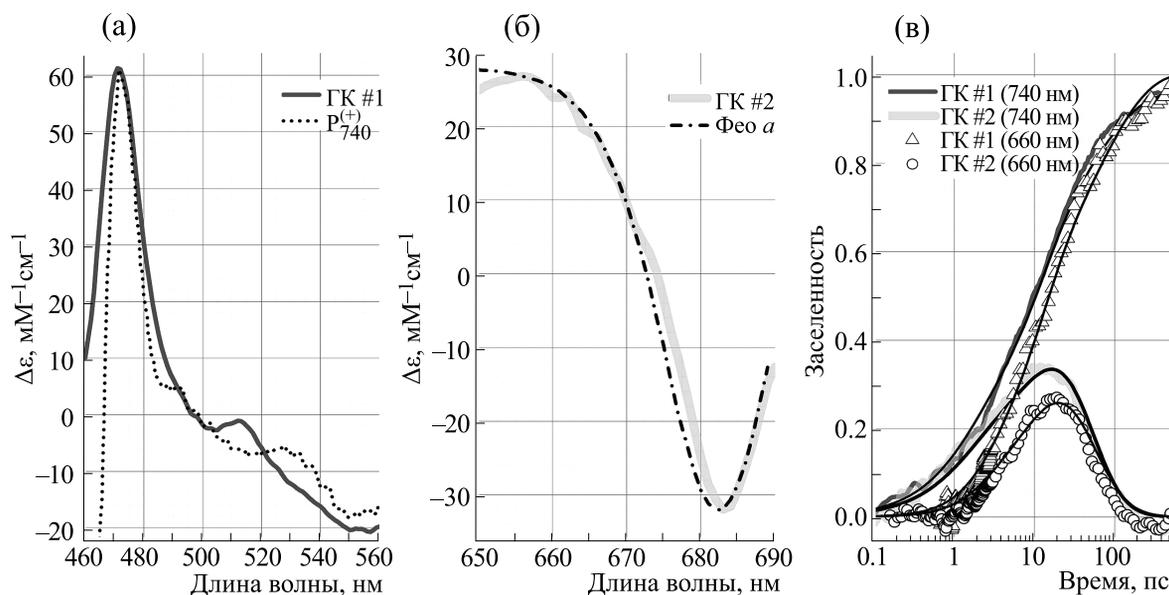


Рис 5. Дифференциальные спектры $\Delta\varepsilon(\lambda)$ главных компонент (ГК), характеризующие поглощение катиона P_{740}^+ в спектральной области #1 (а) и аниона $Фео_{a3}^-$ в спектральной области #2 (б) при возбуждении ФС I-Хл d из *A. marina* на длине волны 740 нм. Переходные спектры (сплошные линии) сопоставлены с дифференциальным спектром поглощения $P_{740}^+ - P_{740}$ (точки) из работы [54] и перевернутым спектром поглощения $Фео a$ в ацетоне (штриховые точки) [55]. Изменение относительных вкладов $P_f(t)$ данных компонент (заселенности) во времени (в) отражают кинетику возникновения интермедиатов P_{740}^+ и $Фео_{a3}^-$ при возбуждении ФС I-Хл d на 740 нм (сплошные линии) и 660 нм (символы). Тонкие черные линии показывают результаты кинетического моделирования.

го, в спектральной динамике в области 450–500 нм присутствует специфическая полоса катиона специальной пары P_{740} [54] (спектральный интервал #1), а в области 760–850 нм наблюдается поглощение катиона и аниона Хл d (спектральный интервал #4).

Численный анализ абсорбционной динамики ФС I-Хл d методом главных компонент позволил определить дифференциальные спектры $\varepsilon_f(\lambda)$ и динамику относительных вкладов $P_f(t)$ катиона P_{740} и аниона $Фео_{a3}^-$ (рис. 5). Сравнение полосы выцветания $Фео_{a3}^-$ в области 680 нм со спектром поглощения феофитина в растворе позволило определить абсолютное количество восстановленного $Фео_{a3}$ и сравнить его кинетику с кинетикой образования катиона P_{740} . Появление сигнала P_{740}^+ происходило одновременно с выцветанием полосы $Фео_{a3}^-$ при временных задержках ~0.2 пс, однако, абсолютная концентрация $Фео_{a3}^-$ была пропорционально ниже концентрации P_{740}^+ . Это свидетельствует о присутствии промежуточного акцептора электрона, которым, вероятнее всего, является Хл_{d2}, перенос электрона с которого на $Фео_{a3}$ происходит быстрее реакции образования первичной ион-радикальной пары $P_{740}^+Хл_{d2}^-$ ($\tau_2 \ll \tau_1$). Таким образом, было

показано, что в ФС I-Хл d из *A. marina* первичным донором электронов является P_{740} , а первичным акцептором – Хл_{d2}, который на временах менее 0.2 пс передает электрон на третий кофактор в цепи $Фео_{a3}$.

Интересно отметить, в случае неизбирательного возбуждения появление сигналов P_{740}^+ и $Фео_{a3}^-$ происходило позже, на временах ~2 пс, чем при возбуждении на 740 нм (рис. 5в, символы). Это указывает на то, что в случае ФС I-Хл d правомерно описание первичных процессов моделью, где скорость разделения зарядов ограничена скоростью переноса энергии возбуждения на реакционный центр (см. выше).

Таким образом, механизм разделения и стабилизации зарядов в ФС I-Хл d подобен тому, что был предложен для ФС I-Хл a в работах [25, 44, 45] и детализировался в дальнейшем в лабораториях А.Ю. Семенова и В.А. Надточенко. В данном механизме первичным донором электрона является специальная пара P_{700} , а первичным акцептором – вторая молекула хлорофилла в одной из ветвей А или В (верхний путь « P_{700} » на Схеме 1). Как и в бактериальном центре, последующий перенос электрона на третий кофактор (в случае бактериального РЦ – бактериофеофитин, в случае ФС I – молекула Хл₃) происходит быстро, поэтому первым наблюдаемым состоянием с

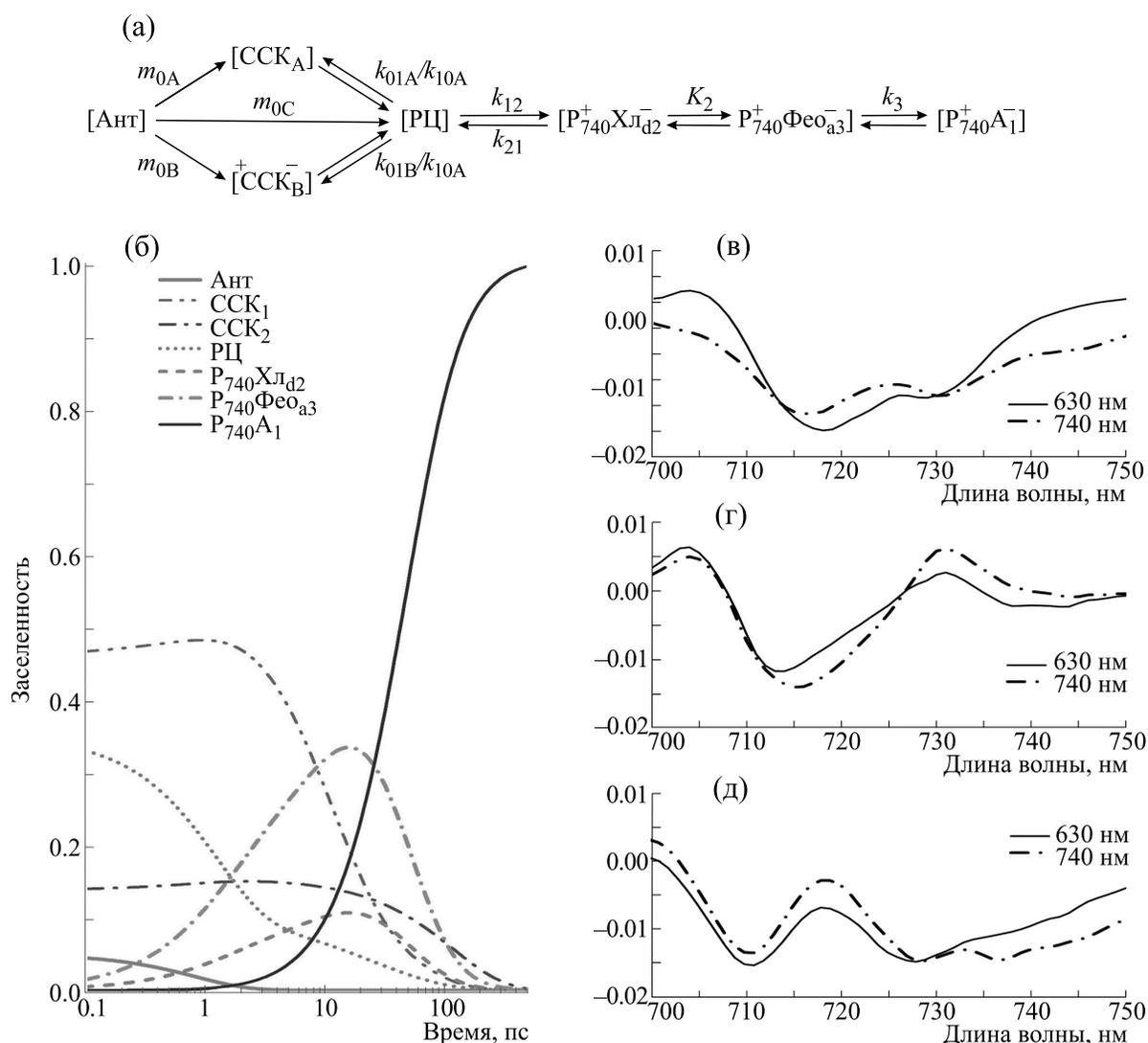


Рис 6. Кинетическое моделирование переноса энергии и электрона в ФС I из *A. marina*. На кинетической схеме (а) квадратными скобками выделены кинетические компартменты. Динамика заселения электронных состояний показана для возбуждения ФС I-Хл *d* дальним красным светом (б). Дифференциальные спектры возбужденного реакционного центра (в), первичной $P_{740}^+X_{ld2}^-$ (г) и вторичной $P_{740}^+A_1^-$ (д) ион-радикальных пар были получены путем разложения абсорбционной динамики ФС I-Хл *d* на главные компоненты при возбуждении на 630 нм (сплошные линии) и 740 нм (пунктирные линии).

разделенными зарядами является пара $P_{700}^+X_{L3}^-$, обычно обозначаемая как $P_{700}^+A_0^-$.

Результаты разложения абсорбционной динамики ФС I-Хл *d* на главные компоненты были проанализированы с помощью кинетической модели, согласующейся со структурными данными [35, 36] и включающей в минимальном варианте семь электронных состояний и шесть кинетических компартментов (рис. 6). По итогам моделирования были получены значения свободной энергии реакций ΔG_1 , ΔG_2 , ΔG_3 и оценки характерных времен τ_1 , τ_2 и τ_3 образования ион-ради-

кальных состояний $P_{740}^+X_{ld2}^-$, $P_{740}^+Feo_{a3}^-$, и $P_{700}^+A_1^-$ соответственно.

Согласно модели, свободная энергия реакции образования первичной ион-радикальной пары $P_{740}^+X_{ld2}^-$ из возбужденного состояния реакционного центра составляет $\Delta G_1 = -34$ мэВ, она протекает с характерным временем $\tau_1 = 1.6$ пс. Установление равновесия между X_{ld2} и Feo_{a3} не удалось разрешить в спектральной динамике, была получена оценка времени $\tau_2 \leq 0.2$ пс и свободной энергии $\Delta G_2 = -29$ мэВ [51]. Образование стабильной ион-радикальной пары $P_{740}^+A_1^-$ про-

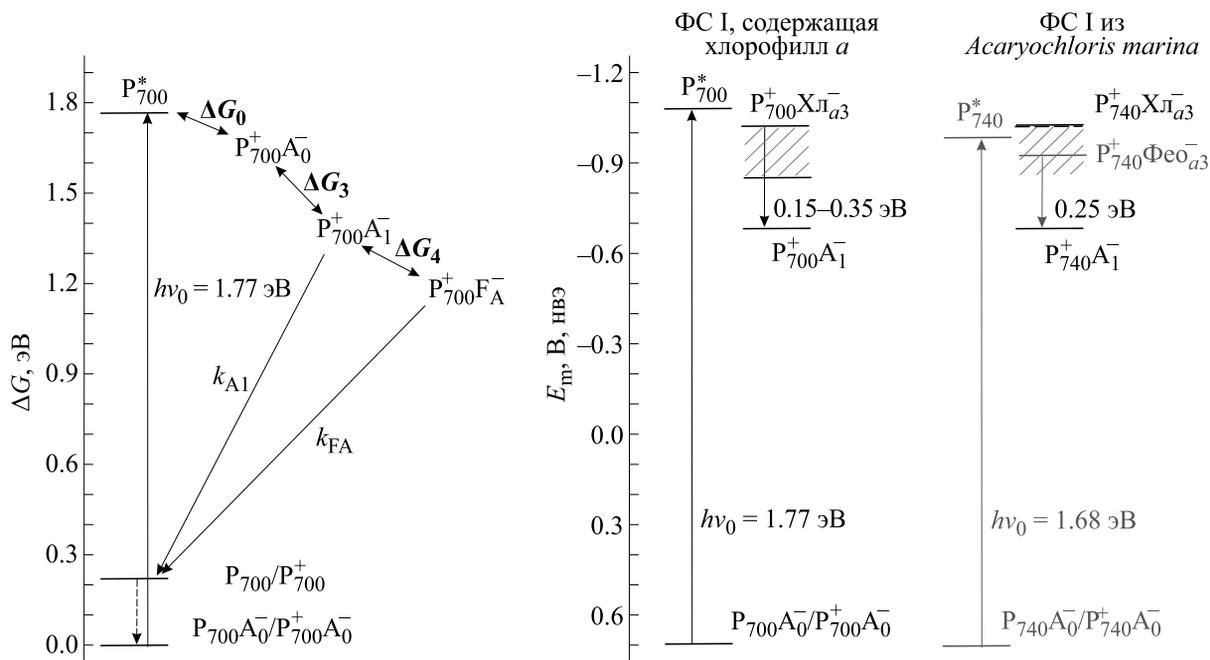


Рис. 7. Уровни свободной энергии различных электронных состояний в ФС I цианобактерий. На диаграмме слева стрелками показаны основные электронные переходы и их энергии относительно основного состояния. На вертикальной оси в центре приведены рабочие окислительно-восстановительные потенциалы кофакторов, участвующих в первичных реакциях разделения зарядов в ФС I-Хл *a* (центр) и ФС I-Хл *d* (справа). Значения энергетических параметров для ФС I-Хл *a* представляют усредненные величины, взятые из литературы. Заштрихованная область показывает разброс имеющихся оценок потенциала A_0 . Соответствующий энергетический уровень для ФС I-Хл *d* получен в результате кинетического моделирования [51].

исходит в ФС I-Хл *d* с характерным временем $\tau_3 \approx 25$ пс.

В рамках рассматриваемой кинетической модели были получены дифференциальные спектры возбужденного состояния реакционного центра (рис. 6в), первичной ион-радикальной пары $P_{740}^+Xl_{d2}^-$ (рис. 6г) и вторичной ион-радикальной пары $P_{740}^+Фео_{a3}^-$ (рис. 6д). В спектре состояния $P_{740}^+Xl_{d2}^-$ на рис. 6д доминирует полоса выцветания 716 нм. Это однозначно указывает на то, что кофактором в положении eC2 является молекула Хл *d*. Форма и спектральное положение этой полосы хорошо соответствуют полосе Хл *d* в области 710 нм, представленной в работе [37] (врезка на рис. 4). В кинетической модели в работе [51] состояние $P_{740}^+Xl_{d2}^-$ появляется со временем 6 пс и исчезает со временем 80 пс, что также соответствует данным работы [37]. Принципиальным отличием от работы [37] является наблюдение синхронного образования катиона P_{740}^+ , аниона $Фео_{a3}^-$ и полосы выцветания Хл *d* в области 716 нм, что соответствует пути « P_{700} » на схеме 1, где P_{740} выступает в качестве первичного донора.

Характерное время образования ион-радикальной пары $P_{740}^+A_1^-$ близко к значениям τ об-

разования пары $P_{700}^+A_1^-$ в ФС I-Хл *a* из различных организмов. Так, для тримеров ФС I из цианобактерии *Synechocystis* 6803 характерное время составило ~ 25 пс [25, 56, 57], для комплексов ФС I из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* – ~ 30 пс [22].

Интересно, что акцепторная часть кофакторов в комплексах ФС I-Хл *d* и ФС I-Хл *a* не различается: это молекулы филлохинона в сайтах связывания A_1 и три железо-серных кластера F_X , F_A и F_B [29, 35, 36, 54]. В качестве растворимого акцептора электрона в клетках *A. marina*, как и во всех других кислород-выделяющих организмах, присутствует ферредоксин (рис. 3). Таким образом, в комплексах ФС I-Хл *d* пигментный состав значительно отличается на тех участках, которые отвечают за поглощение световой энергии (внутренняя антенна ФС I-Хл *d* содержит вместо хлорофилла *a* и β -каротина хлорофилл *d* и α -каротин) и за первичные фотохимические реакции (димер Хл *d* в качестве специальной пары, Хл *d* и Фео *a* в сайтах связывания eC2 и eC3).

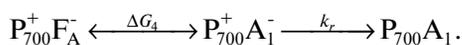
Минимальная энергия кванта света, необходимая для разделения зарядов в ФС I-Хл *d*, составляет 1.68 эВ – на ~ 90 мэВ меньше, чем в ФС I-Хл *a* (рис. 7). Следует однако отметить, что освещение ФС I-Хл *a* некоторых видов цианобактерий и водорослей в дальней красной об-

ласти спектра 760–800 нм ведет к разделению зарядов даже при криогенных температурах [58, 59]. При этом редокс-потенциал пары P_{740}/P_{740}^+ близок к потенциалу P_{700}/P_{700}^+ , он лежит в диапазоне 425–450 мВ [30, 54, 60]. Значит, энергия возбужденного состояния P_{740} должна быть ниже энергии P_{700}^* . Однако снижение энергии P_{740}^* по сравнению с P_{700}^* на 100 мэВ существенно не сказывается на кинетике стабилизации зарядов в ФС I-Xл *d*. Можно предполагать, что наблюдаемые изменения в составе кофакторов на донорном участке ФС I-Xл *d* обусловлены необходимостью поддержания отрицательных значений ΔG реакций разделения и стабилизации зарядов.

ЭНЕРГЕТИКА РЕАКЦИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ ЗАРЯДОВ В КОМПЛЕКСАХ ФС I-Xл *d* И ФС I-Xл *a*

Средноточечные потенциалы (E_m) восстановления железо-серных кластеров, выступающих в ФС I-Xл *a* в качестве терминальных акцепторов, были напрямую определены титрованием: $E_m(F_{A/B}) = -0.50$ В [61] и $E_m(F_X) = -0.61$ В [62]. Аналогичных данных для ФС I-Xл *d* не получено; по всей видимости, они близки к потенциалам ФС I-Xл *a* [29, 54]. Средноточечные потенциалы восстановления филохинона A_1 и Xл *a* в сайтах A_0 лежат ниже предела окислительно-восстановительного титрования (рис. 2а). Их оценку можно проводить, исходя из доступных кинетических параметров прямых и обратных реакций переноса электрона в акцепторной части ФС I [20, 63–67], а также электростатических расчетов, использующих данные потенциометрического титрования и квантово-химического моделирования [68–71]. Для оценки энергетических уровней первичных и вторичных ион-радикальных пар по кинетическим данным были использованы два альтернативных подхода.

В первом подходе энергия образования ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ оценивается по скорости термоактивируемой рекомбинации зарядов конечного состояния $P_{700}^+F_{A/B}^-$ [63, 72]



Рекомбинация зарядов в интактных комплексах ФС I-Xл *a* при комнатной температуре происходит с константой скорости $k_{FA} = 8$ с⁻¹, известна также скорость прямой рекомбинации зарядов $P_{700}^+A_1^- \rightarrow P_{700}A_1$ в химически модифицированных комплексах $k_{A_1} = 9 \cdot 10^3$ с⁻¹, на основе этих данных была получена оценка свободной энергии $\Delta G_4 = 0.15$ – 0.19 эВ и потенциала восстановления

A_1 в диапазоне $-0,68$ В (рис. 7, диаграмма слева) [27, 50].

Во втором подходе энергию первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ относительно возбужденного состояния ФС I-Xл *a* оценивали на основании экспериментов по установлению равновесия первичных реакций переноса энергии и разделения зарядов, а также скорости замедленной флуоресценции образующихся ион-радикальных пар:



Оценки соответствующей разницы свободной энергии ΔG_0 варьировали от 0.25 эВ [21, 22, 73, 74] до значительно меньших значений (10–40 мэВ) [75–77]. Суммарная энергия образования первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ из невозбужденного состояния $P_{700}A_0$ связана с энергией кванта $h\nu_0$, движущей силой первичной реакции разделения зарядов ΔG_0 и равновесными средноточечными потенциалами P_{700}^+ и A_0^- следующим соотношением:

$$q_e [E_m(P_{700}^+ / P_{700}) - E_m(A_0 / A_0^-) - \Delta\phi_0] = h\nu_0 - \Delta G_0,$$

где q_e – элементарный заряд, $\Delta\phi_0$ – электростатическое взаимодействие катиона P_{700}^+ и аниона A_0^- . Расчет электростатического взаимодействия P_{700}^+ и A_0^- дает оценку $\Delta\phi_0$ около -0.24 В, на эту величину потенциал образуемой ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ (операционный потенциал) отличается от значения средноточечного потенциала A_0 в условиях равновесного титрования [50, 68]. Понижение энергии пары $P_{700}^+A_0^-$ за счет электростатического взаимодействия отмечено вертикальной пунктирной стрелкой на рис. 7, где в левой части представлены энергетические уровни электронных состояний ФС I-Xл *a*. С учетом сделанных выше оценок операционный потенциал ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ в канонической ФС I-Xл *a* составляет $-(0.84$ – $1.08)$ В. На рис. 7 в центре показаны операционные потенциалы электронных состояний относительно нормального водородного электрода. Принимая потенциал пары $P_{740}^+A_1^-$ равным -0.68 В, изменение свободной энергии ΔG_3 для реакции переноса электрона $A_0 \rightarrow A_1$ составляет 0.16 – 0.40 эВ [78].

Сходные оценки были получены для энергии образования первичной ион-радикальной пары $P_{740}^+A_0^-$ в ФС I-Xл *d* из *A. marina* [51]. Однако для данной системы, пользуясь спектральным отлич-

нием Хл_{d2} и Фео_{a3} , удалось сделать отдельные оценки свободной энергии образования состояний $\text{P}_{740}^+\text{Хл}_{d2}^-$ и $\text{P}_{740}^+\text{Фео}_{a3}^-$ ($\Delta G_1 = -34$ мэВ и $\Delta G_2 = -29$ мэВ соответственно). Суммарная энергия $\Delta G_0 = \Delta G_1 + \Delta G_2$ образования стабильной первичной ион-радикальной пары $\text{P}_{740}^+\text{Фео}_{a3}^-$ относительно возбужденного состояния P_{740}^* составила -60 мэВ. В соответствии с этими оценками, восстановительный потенциал ион-радикальной пары $\text{P}_{740}^+\text{А}_0^-$ находится в интервале -0.9 ± 0.1 В, а равновесный среднеточечный потенциал $E_m(\text{Фео}_{a3}) \approx -1.17$ В (рис. 7). Исходя из этого, изменение свободной энергии ΔG_3 для реакции переноса электрона $\text{А}_0 \rightarrow \text{А}_1$ составляет 0.25 эВ.

Таким образом, значение среднеточечного потенциала $\text{Фео } a$ в положении eС3 находится в диапазоне -1.15 ± 0.1 В. В органических растворителях потенциал восстановления $\text{Фео } a$ приблизительно на 200 мВ более положителен, чем потенциал $\text{Хл } a$ [79, 80]. Если предположить, что эта разница сохраняется в белковом окружении, то замена $\text{Хл } a$ на $\text{Фео } a$ позволила *A. marina* компенсировать потерю энергии кванта при замене $\text{Хл } a$ на $\text{Хл } d$.

Однако остается открытым вопрос, почему в сайте eС3 присутствует именно $\text{Фео } a$, а не $\text{Хл } d$, потенциал которого в органических растворителях также почти на 200 мВ больше, чем у $\text{Хл } a$. Ответ заключается в структурных особенностях комплекса $\text{ФС I-Хл } d$: кислород карбонильной группы Хл_{d2} , которого нет в Хл_{a3} , обращен в сторону хлоринового кольца Фео_{a3} . Расстояние между карбонильным кислородом Хл_{d2} и плоскостью кольца составляет всего 3.2 \AA , что ведет к деформации макроцикла Фео_{a3} и обуславливает делокализацию электронных орбиталей гетеродимера $\text{Хл}_{d2}\text{-Фео}_{a3}$. В канонической в $\text{ФС I-Хл } a$ отрицательный электрический заряд в гетеродимере $[\text{Хл}_{d2}\text{-Хл}_{a3}]^-$ делокализован в пропорции 1:3 [81, 82], что в точности соответствует величине $\Delta G_2 = -29$ мэВ, определенной для $\text{ФС I-Хл } d$. Если бы на месте $\text{Фео } a$ в положении eС3 находился $\text{Хл } d$, то атом магния макроцикла дополнительно взаимодействовал бы с карбонильными кислородом, что изменило бы пентагональную координацию магния на гексагональную. Это, несомненно, повлияло бы на энергетическую конфигурацию реакционного центра $\text{ФС I-Хл } d$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кинетические и термодинамические параметры первичных реакций разделения зарядов в ре-

акционном центре канонической ФС I , содержащей $\text{Хл } a$, остаются предметом многолетних дискуссий. Кинетический анализ фемтосекундных фотохимических процессов в ФС I из *A. marina*, в фотосинтетическом аппарате которой присутствует длинноволновый $\text{Хл } d$, позволил однозначно определить последовательность первичных реакций разделения зарядов в реакционном центре, содержащем $\text{Фео } a$ в обеих ветвях переноса электрона. Показано, что первичным донором электронов в этой системе является специальная пара P_{740} , а первичный акцептор представляет собой сопряженный гетеродимер Хл_{d2} и Фео_{a3} . При возбуждении ФС I из *A. marina* в ближнем инфракрасном диапазоне образование первичной ион-радикальной пары происходит с эффективным временем 1.6 пс и сопровождается понижением свободной энергии на 0.06 эВ. Изменение ΔG при последующем переносе электрона на филлохинон составляет $0.15\text{--}0.4$ эВ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторский коллектив благодарит А.Ю. Семёнова за помощь в работе над обзором.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ:

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10085).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manning W. M. and Strain H. H. Chlorophyll D, a green pigment of red algae. *J. Biol. Chem.*, **151** (1), 1–19 (1943). DOI: 10.1016/s0021-9258(18)72109-1
2. Tomo T. and Allakhverdiev S. I. Chlorophyll species and their functions in the photosynthetic energy conversion. In *Photosynthesis: Molecular approaches to solar energy conversion (Advances in photosynthesis and respiration, vol. 47)*, Ed. by J. Shen, K. Satoh, and S. I. Allakhverdiev (Springer, Cham), pp. 133–161. DOI: 10.1007/978-3-030-67407-6_5
3. Miyashita H., Ikemoto H., Kurano N., Adachi K., Chihara M., and Miyachi S. Chlorophyll d as a major pigment. *Nature*, **383** (6599), 402 (1996). DOI: 10.1038/383402a0

4. Li Y., Scales N., Blankenship R. E., Willows R. D., and Chen M. Extinction coefficient for red-shifted chlorophylls: Chlorophyll d and chlorophyll f. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, **1817** (8), 1292–1298 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.026
5. Hooper J. K., Eggink L. L., and Chen M. Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **94** (2–3), 387–400 (2007). DOI: 10.1007/s11120-007-9181-1
6. Nugent J. H. A., Purton S., and Evans M. C. W. Oxygenic Photosynthesis in algae and cyanobacteria: electron transfer in photosystems I and II. In *Photosynthesis in Algae (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 14)*, Ed. by Larkum A. W. D., Douglas S. E., and Raven J. A. (Springer, Dordrecht, 2003), pp. 133–156. DOI: 10.1007/978-94-007-1038-2_7
7. Allakhverdiev S. I., Tsuchiya T., Watabe K., Kojima A., Los D. A., Tomo T., Klimov V. V., and Mimuro M. Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (Q A)- and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll a and chlorophyll d. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (19), 8054–8058 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1100173108
8. Razeghifard M. R., Chen M., Hughes J. L., Freeman J., Krausz E., and Wydrzynski T. Spectroscopic studies of photosystem II in chlorophyll d-containing *Acaryochloris marina*. *Biochemistry*, **44** (33), 11178–11187 (2005). DOI: 10.1021/bi048314c
9. Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., and Krauß N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411** (6840), 909–917 (2001). DOI: 10.1038/35082000
10. Gobets B., Van Stokkum I. H. M., Van Mourik F., Dekker J. P., and Van Grondelle R. Excitation wavelength dependence of the fluorescence kinetics in photosystem I particles from *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus elongatus*. *Biophys. J.*, **85** (6), 3883–3898 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74803-6
11. Herascu N., Hunter M. S., Shafiei G., Najafi M., Johnson T. W., Fromme P., and Zazubovich V. Spectral hole burning in cyanobacterial photosystem I with P700 in oxidized and neutral states. *J. Phys. Chem. B*, **120** (40), 10483–10495 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b07803
12. Hatazaki S., Sharma D. K., Hirata S., Nose K., Iyoda T., Kölsch A., Lokstein H., and Vacha M. Identification of short- and long-wavelength emitting chlorophylls in cyanobacterial photosystem I by plasmon-enhanced single-particle spectroscopy at room temperature. *J. Phys. Chem. Lett.*, **9** (22), 6669–6675 (2018). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.8b03064
13. Byrdin M., Jordan P., Krauss N., Fromme P., Stehlik D., and Schlodder E. Light harvesting in photosystem I: Modeling based on the 2.5-Å structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*. *Biophys. J.*, **83** (1), 433–457 (2002). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75181-3
14. Yang M., Damjanović A., Vaswani H. M., and Fleming G. R. Energy transfer in photosystem I of cyanobacteria *Synechococcus elongatus*: Model study with structure-based semi-empirical Hamiltonian and experimental spectral density. *Biophys. J.*, **85** (1), 140–158 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74461-0
15. Kramer T., Noack M., Reimers J. R., Reinefeld A., Rodríguez M., and Yin S. Energy flow in the Photosystem I supercomplex: Comparison of approximative theories with DM-HEOM. *Chem. Phys.*, **515** 262–271 (2018). DOI: 10.1016/j.chemphys.2018.05.028
16. Akhtar P., Caspy I., Nowakowski P. J., Malavath T., Nelson N., Tan H. S., and Lambrev P. H. Two-dimensional electronic spectroscopy of a minimal photosystem I complex reveals the rate of primary charge separation. *J. Am. Chem. Soc.*, **143** (36), 14601–14612 (2021). DOI: 10.1021/jacs.1c05010
17. Müller M. G., Niklas J., Lubitz W., and Holzwarth A. R. Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. I. A new interpretation of the energy trapping and early electron transfer steps in photosystem I. *Biophys. J.*, **85** (6), 3899–3922 (2003). DOI: 10.1016/s0006-3495(03)74804-8
18. Li Y., Van Der Est A., Lucas M. G., Ramesh V. M., Gu F., Petrenko A., Lin S., Webber A. N., Rappaport F., and Redding K. Directing electron transfer within Photosystem I by breaking H-bonds in the cofactor branches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (7), 2144–2149 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0506537103
19. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Mamedov M. D., Petrova A. A., Aybush A. V., Shuvalov V. A., Semenov A. Y., and Nadochenko V. A. Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q Y band. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1858** (11), 895–905 (2017). DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.08.008
20. Srinivasan N. and Golbeck J. H. Protein-cofactor interactions in bioenergetic complexes: the role of the A1A and A1B phylloquinones in Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787** (9), 1057–88 (2009). DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.04.010
21. Santabarbara S., Heathcote P., and Evans M. C. W. Modelling of the electron transfer reactions in Photosystem I by electron tunnelling theory: The phylloquinones bound to the PsaA and the PsaB reaction centre subunits of PS I are almost isoenergetic to the iron-sulfur cluster FX. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1708** (3), 283–310 (2005). DOI: 10.1016/j.bbabi.2005.05.001
22. Müller M. G., Slavov C., Luthra R., Redding K. E., and Holzwarth A. R. Independent initiation of primary electron transfer in the two branches of the photosystem I reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (9), 4123–4128 (2010). DOI: 10.1073/pnas.0905407107
23. Kaucikas M., Nürnberg D., Dorlhac G., Rutherford A. W., and van Thor J. J. Femtosecond visible transient absorption spectroscopy of chlorophyll f-

- containing photosystem I. *Biophys. J.*, **112** (2), 234–249 (2017). DOI: 10.1016/j.bpj.2016.12.022
24. Van Stokkum I. H. M., Desquilbet T. E., Van Der Weij-De Wit C. D., Snellenburg J. J., Van Grondelle R., Thomas J. C., Dekker J. P., and Robert B. Energy transfer and trapping in red-chlorophyll-free photosystem I from *Synechococcus* WH 7803. *J. Phys. Chem. B*, **117** (38), 11176–11183 (2013). DOI: 10.1021/jp401364a
25. Shelaev I. V., Gostev F. E., Mamedov M. D., Sarkisov O. M., Nadtochenko V. A., Shuvalov V. A., and Semenov A. Y. Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1797** (8), 1410–1420 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.026
26. Petrova A. A., Boskhomdzhieva B. K., Milanovsky G. E., Koksharova O. A., Mamedov M. D., Cherepanov D. A., and Semenov A. Y. Interaction of various types of photosystem I complexes with exogenous electron acceptors. *Photosynth. Res.*, **133** (1–3), 175–184 (2017). DOI: 10.1007/s11120-017-0371-1
27. Milanovsky G. E., Petrova A. A., Cherepanov D. A., and Semenov A. Y. Kinetic modeling of electron transfer reactions in photosystem I complexes of various structures with substituted quinone acceptors. *Photosynth. Res.*, **133** (1–3), 185–199 (2017). DOI: 10.1007/s11120-017-0366-y
28. Björn L. O., Papageorgiou G. C., Blankenship R. E., and Govindjee. A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynth. Res.*, **99** (2), 85–98 (2009). DOI: 10.1007/s11120-008-9395-x
29. Hu Q., Miyashita H., Iwasaki I., Kurano N., Miyachi S., Iwaki M., and Itoh S. A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (22), 13319–13323 (1998). DOI: 10.1073/pnas.95.22.13319
30. Tomo T., Kato Y., Suzuki T., Akimoto S., Okubo T., Noguchi T., Hasegawa K., Tsuchiya T., Tanaka K., Fukuya M., Dohmae N., Watanabe T., and Mimuro M. Characterization of highly purified photosystem I complexes from the chlorophyll d-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017. *J. Biol. Chem.*, **283** (26), 18198–18209 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M801805200
31. Akiyama M., Miyashita H., Kise H., Watanabe T., Miyachi S., and Kobayashi M. Detection of chlorophyll d' and pheophytin a in a chlorophyll d-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*. *Anal. Sci.*, **17** (1), 205–208 (2001). DOI: 10.2116/analsci.17.205
32. Akiyama M., Miyashita H., Kise H., Watanabe T., Mimuro M., Miyachi S., and Kobayashi M. Quest for minor but key chlorophyll molecules in photosynthetic reaction centers - Unusual pigment composition in the reaction centers of the chlorophyll d-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.*, **74** (2), 97–107 (2002). DOI: 10.1023/A:1020915506409
33. Sivakumar V., Wang R., and Hastings G. Photo-oxidation of P740, the primary electron donor in photosystem I from *Acaryochloris marina*. *Biophys. J.*, **85** (5), 3162–3172 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74734-1
34. Mino H., Kawamori A., Aoyama D., Tomo T., Iwaki M., and Itoh S. Proton ENDOR study of the primary donor P740+, a special pair of chlorophyll d in photosystem I reaction center of *Acaryochloris marina*. *Chem. Phys. Lett.*, **411** (1–3), 262–266 (2005). DOI: 10.1016/j.cplett.2005.06.033
35. Hamaguchi T., Kawakami K., Shinzawa-Itoh K., Inoue-Kashino N., Itoh S., Ifuku K., Yamashita E., Maeda K., Yonekura K., and Kashino Y. Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina*. *Nat. Commun.*, **12** (1), 1–10 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-22502-8
36. Xu C., Zhu Q., Chen J., Shen L., Yi X., Huang Z., Wang W., Chen M., Kuang T., Shen J., Zhang X., and Han G. A unique photosystem I reaction center from a chlorophyll d-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *J. Integr. Plant Biol.*, **63** (10), 1740–1752 (2021). DOI: 10.1111/jipb.13113
37. Kumazaki S., Abiko K., Ikegami I., Iwaki M., and Itoh S. Energy equilibration and primary charge separation in chlorophyll d-based photosystem I reaction center isolated from *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.*, **530** (1–3), 153–157 (2002). DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03446-4
38. Kumazaki S., Iwaki M., Ikegami I., Kandori H., Yoshihara K., and Itoh S. Rates of primary electron transfer reactions in the photosystem I reaction center reconstituted with different quinones as the secondary acceptor. *J. Phys. Chem.*, **98** (43), 11220–11225 (1994). DOI: 10.1021/j100094a033
39. Savikhin S., Xu W., Martinsson P., Chitnis P. R., and Struve W. S. Kinetics of charge separation and A0- → A1 electron transfer in photosystem I reaction centers. *Biochemistry*, **40** (31), 9282–9290 (2001). DOI: 10.1021/bi0104165
40. Holzwarth A. R., Müller M. G., Niklas J. and Lubitz W. Ultrafast transient absorption studies on Photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 2: Mutations near the P700 reaction center chlorophylls provide new insight into the nature of the primary electron donor. *Biophys. J.*, **90** (2), 552–565 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.105.059824
41. Donato M. Di, Stahl A. D., Van Stokkum I. H. M., Grondelle R. Van, and Groot M. L. Cofactors involved in light-driven charge separation in photosystem I identified by subpicosecond infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **50** (4), 480–490 (2011). DOI: 10.1021/bi101565w
42. Nürnberg D. J., Morton J., Santabarbara S., Telfer A., Joliot P., Antonaru L. A., Ruban A. V., Cardona T., Krausz E., Boussac A., Fantuzzi A., and Rutherford A. W. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science*, **360** (6394), 1210–1213 (2018). DOI: 10.1126/science.aar8313

43. Zamzam N., Kaucikas M., Nürnberg D. J., Rutherford A. W., and Van Thor J. J. Femtosecond infrared spectroscopy of chlorophyll f-containing photosystem I. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **21** (3), 1224–1234 (2019). DOI: 10.1039/c8cp05627g
44. Melkozernov A. N., Lin S., and Blankenship R. E. Excitation dynamics and heterogeneity of energy equilibration in the core antenna of photosystem I from the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, **39** (6), 1489–1498 (2000). DOI: 10.1021/bi991644q
45. Savikhin S. and Jankowiak R. Mechanism of primary charge separation in photosynthetic reaction centers. In *The Biophysics of Photosynthesis (Biophysics for the Life Sciences, vol 11)* Ed. by J. Golbeck and A. van der Est (Springer, New York, 2014), pp. 193–240. DOI: 10.1007/978-1-4939-1148-6_7
46. Byrdin M., Rimke I., Schlodder E., Stehlik D., and Roelofs T. A. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophys. J.*, **79** (2), 992–1007 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76353-3
47. Savikhin S., Xu W., Chitnis P. R. and Struve W. S. Ultrafast primary processes in PS I from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Roles of P700 and A0. *Biophys. J.*, **79** (3), 1573–1586 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76408-3
48. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Nadtochenko V. A., Xu W., Golbeck J. H., and Semenov A. Y. Symmetry breaking in photosystem I: ultrafast optical studies of variants near the accessory chlorophylls in the A- and B-branches of electron transfer cofactors. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **20** (9), 1209–1227 (2021). DOI: 10.1007/s43630-021-00094-y
49. Trissl H. W. Determination of the quenching efficiency of the oxidized primary donor of Photosystem I, P700⁺: Implications for the trapping mechanism. *Photosynth. Res.*, **54** (3), 237–240 (1997). DOI: 10.1023/A:1005981016835
50. Brettel K. Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, **1318** (3), 322–373 (1997). DOI: 10.1016/S0005-2728(96)00112-0
51. Petrova A. A., Casazza A. P., Shelaev I. V., Gostev F. E., Aybush A. V., Nadtochenko V. A., Semenov A. Y., Santabarbara S., and Cherepanov D. A. Role of pheophytin a in the primary charge separation of photosystem I from *Acaryochloris marina*: Femtosecond optical studies of excitation energy and electron transfer reactions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1864** (3), 148984 (2023). DOI: 10.1016/j.bbabi.2023.148984
52. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Aybush A. V., Mamedov M. D., Shuvalov V. A., Semenov A. Y., and Nadtochenko V. A. Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I. *Photosynth. Res.*, **146**, 55–73 (2020). DOI: 10.1007/s1120-020-00731-0
53. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Petrova A., Aybush A. V., Nadtochenko V. A., Xu W., Golbeck J. H., and Semenov A. Y. Primary charge separation within the structurally symmetric tetrameric Chl2APAPBChl2B chlorophyll exciplex in photosystem I. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **217** 112154 (2021). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112154
54. Schenderlein M., Çetin M., Barber J., Telfer A., and Schlodder E. Spectroscopic studies of the chlorophyll d containing photosystem I from the cyanobacterium, *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1777** (11), 1400–1408 (2008). DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.08.008
55. Eijkelhoff C. and Dekker J. P. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynth. Res.*, **52** (1), 69–73 (1997). DOI: 10.1023/A:1005834006985
56. Dashdorj N., Xu W., Martinsson P., Chitnis P. R., and Savikhin S. Electrochromic shift of chlorophyll absorption in photosystem I from *Synechocystis* sp. PCC 6803: a probe of optical and dielectric properties around the secondary electron acceptor. *Biophys. J.*, **86** (5), 3121–3130 (2004). DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74360-X
57. Chauvet A., Dashdorj N., Golbeck J. H., Johnson T. W., and Savikhin S. Spectral resolution of the primary electron acceptor A0 in Photosystem I. *J. Phys. Chem. B*, **116** (10), 3380–6 (2012). DOI: 10.1021/jp211246a
58. Mokvist F., Mamedov F. and Styring S. Defining the far-red limit of photosystem I: the primary charge separation is functional to 840 nm. *J. Biol. Chem.*, **289** (35), 24630–9 (2014). DOI: 10.1074/jbc.M114.555649
59. Schlodder E., Lenzian F., Meyer J., Çetin M., Brecht M., Renger T., and Karapetyan N. V. Long-wavelength limit of photochemical energy conversion in Photosystem I. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (10), 3904–3918 (2014). DOI: 10.1021/ja412375j
60. Bailleul B., Johnson X., Finazzi G., Barber J., Rappaport F., and Telfer A. The thermodynamics and kinetics of electron transfer between cytochrome b6f and photosystem I in the chlorophyll d-dominated cyanobacterium, *Acaryochloris marina*. *J. Biol. Chem.*, **283** (37), 25218–25226 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M803047200
61. Golbeck J. H., Parrett K. G., and McDermott A. E. Photosystem I charge separation in the absence of center A and B. III. Biochemical characterization of a reaction center particle containing P-700 and FX. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **893** (2), 149–160 (1987). DOI: 10.1016/0005-2728(87)90034-X
62. Parrett K. G., Mehari T., Warren P. G., and Golbeck J. H. Purification and properties of the intact P-700 and Fx-containing Photosystem I core protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **973** (2), 324–32 (1989). DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80439-6

63. Brettel K. and Leibl W. Electron transfer in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1507** (1–3), 100–114 (2001). DOI: 10.1016/S0005-2728(01)00202-X
64. Vassiliev I. R., Jung Y. S., Mamedov M. D., Semenov A. Yu., and Golbeck J. H. Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in Photosystem I. *Biophys. J.*, **72** (1), 301–315 (1997). DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78669-7
65. Sun J., Hao S., Radle M., Xu W., Shelaev I., Nadochenko V., Shuvalov V., Semenov A., Gordon H., van der Est A., and Golbeck J. H. Evidence that histidine forms a coordination bond to the A0A and A0B chlorophylls and a second H-bond to the A1A and A1B phylloquinones in M688HPsaA and M668HPsaB variants of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1837** (8), 1362–1375 (2014). DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.04.004
66. Agalarov R. and Brettel K. Temperature dependence of biphasic forward electron transfer from the phylloquinone(s) A1 in photosystem I: Only the slower phase is activated. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1604** (1), 7–12 (2003). DOI: 10.1016/S0005-2728(03)00024-0
67. Jordan R., Nessau U., and Schlodder E. Charge Recombination Between the Reduced Iron-Sulphur Clusters and P700+. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects (Proc. XIth Int. Congr. Photosynth.)*, Ed. by G. Garab (Springer, Dordrecht, 1998), vol. I, pp. 663–666. DOI: 10.1007/978-94-011-3953-3_157
68. Ptushenko V. V., Cherepanov D. A., Krishtalik L. I., and Semenov A. Y. Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I. *Photosynth. Res.*, **97** (1), 55–74 (2008). DOI: 10.1007/s11120-008-9309-y
69. Cherepanov D. A., Milanovsky G. E., Nadochenko V. A., and Semenov A. Y. Energy barrier of photoinduced charge separation in the reaction centers of photosystems I and II. *Russ. J. Phys. Chem. B*, **17** (3), 594–599 (2023).
70. Ishikita H. and Knapp E.-W. Redox potential of quinones in both electron transfer branches of photosystem I. *J. Biol. Chem.*, **278** (52), 52002–11 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M306434200
71. Kawashima K. and Ishikita H. Structural Factors That Alter the Redox Potential of Quinones in Cyanobacterial and Plant Photosystem I. *Biochemistry*, **56** (24), 3019–3028 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00082
72. Shinkarev V. Functional modeling of electron transfer in photosynthetic reaction centers. In *Photosystem I. The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 24)*, Ed. by J. H. Golbeck, (Springer, Dordrecht, 2006). DOI: 10.1007/978-1-4020-4256-0_36
73. Kleinharenbrink F. A. M., Hastings G., Blankenship R. E., and Wittmershaus B. P. Delayed fluorescence from Fe-S type photosynthetic reaction centers at low redox potential. *Biochemistry*, **33** (10), 3096–3105 (1994). DOI: 10.1021/bi00176a044
74. Molotokaite E., Remelli W., Casazza A. P., Zucchelli G., Polli D., Cerullo G., and Santabarbara S. Trapping dynamics in photosystem I-light harvesting complex i of higher plants is governed by the competition between excited state diffusion from low energy states and photochemical charge separation. *J. Phys. Chem. B*, **121** (42), 9816–9830 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b07064
75. Giera W., Ramesh V. M., Webber A. N., van Stokkum I., van Grondelle R., and Gibasiewicz K. Effect of the P700 pre-oxidation and point mutations near A0 on the reversibility of the primary charge separation in Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1797** (1), 106–112 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.09.006
76. Holzwarth A. R., Müller M. G., Niklas J., and Lubitz W. Charge recombination fluorescence in photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phys. Chem. B*, **109** (12), 5903–5911 (2005). DOI: 10.1021/jp046299f
77. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Aybush A. V., Mamedov M. D., Shen G., Nadochenko V. A., Bryant D. A., Semenov A. Y., and Golbeck J. H. Evidence that chlorophyll f functions solely as an antenna pigment in far-red-light photosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1861** (5–6), 148184 (2020). DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148184
78. Cherepanov D. A., Semenov A. Y., Mamedov M. D., Aybush A. V., Gostev F. E., Shelaev I. V., Shuvalov V. A., and Nadochenko V. A. Current state of the primary charge separation mechanism in photosystem I of cyanobacteria. *Biophys. Rev.*, **14** (4), 805–820 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00983-1
79. Wasielewski M. R., Smith R. L., and Kostka A. G. Electrochemical production of chlorophyll a and pheophytin a excited states. *J. Am. Chem. Soc.*, **102** (23), 358 (1981). DOI: 10.1021/JA00543A004/ASSET/JA00543A004.FP.PNG_V03
80. Kobayashi M., Ohashi S., Iwamoto K., Shiraiwa Y., Kato Y., and Watanabe T. Redox potential of chlorophyll d in vitro. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1767** (6), 596–602 (2007). DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.02.015
81. Gorka M., Charles P., Kalendra V., Baldansuren A., Lakshmi K. V., and Golbeck J. H. A dimeric chlorophyll electron acceptor differentiates type I from type II photosynthetic reaction centers. *iScience*, **24** (7), 102719 (2021). DOI: 10.1016/j.isci.2021.102719
82. Gorka M., Baldansuren A., Malnati A., Gruszecki E., Golbeck J. H., and Lakshmi K. V. Shedding light on primary donors in photosynthetic reaction centers. *Front. Microbiol.*, **12** 2776 (2021). DOI: 10.3389/fmicb.2021.735666

Photochemical Energy Conversion of Far-Red Light in Photosystem I Reaction Centers from Cyanobacterium *Acaryochloris marina*

A.A. Petrova*, A. P. Casazza**, S. Santabarbara**, and D.A. Cherepanov*, ***

*A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

**Photosynthesis Research Unit, National Research Council of Italy, Via Corti 12, Milano, 20133 Italy

***N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

Conversion of near-infrared light energy by photosynthetic pigment-protein complexes has been the focus of intensive research in recent years because of the discovery of cyanobacteria with photosynthetic apparatus, which contains chlorophyll *f* and *d* that can absorb long-wave light. Among these cyanobacteria, *Acaryochloris marina* occupies a special place. Its photosystem I contains predominantly chlorophyll *d*, it is the component of the special P₇₄₀ pair with the absorption spectrum shifted to the red region by 40 nm. This causes a decrease in the energy of the excited state of the special P₇₄₀ pair by ~0.1 eV as opposed to photosystem I that contains chlorophyll *a* molecules. The complexes of photosystem I from *A. Marina* have some other particularities; they are: four molecules of chlorophyll *a* of the reaction center are replaced by chlorophyll *d* molecules, and the third pair of chlorophyll *a* molecules involved in electron transfer is replaced by pheophytin *a* molecules. The presence of spectrally diverse cofactors (chlorophyll *d* and pheophytin *a* molecules) has made it possible to reliably identify the intermediate compounds of the primary reactions of primary charge separation in photosystem I. This review presents the findings of a research study on photochemical energy conversion in the reaction centers of photosystem I from *A. marina* and potential mechanisms that compensate energy losses during the utilization of low-energy far-red light for photo-synthesis.

Keywords: photosynthesis, far-red light, chlorophyll d, photosystem I, charge separation, kinetic modeling

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМ I И II

© 2024 г. В.З. Пашенко*, Е.П. Лукашев*, М.Д. Мамедов**, Д.А. Гвоздев*.,#,
Б.Н. Корватовский*, П.П. Нокс*, М.Г. Страховская*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234 Россия

**Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/40, Москва, 119992 Россия

#E-mail: danil131054@mail.ru

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 29.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

Исследовано влияние катионных антисептиков (в микромолярных концентрациях) на изолированные из растений шпината активные коровые комплексы ФСII с интактным комплексом окисления воды и на коровые комплексы ФСI из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803. Из исследованных антисептиков (мирамистина, хлоргексидина, октенидина и пиклоксидина) наибольший эффект оказывал октенидин. Сделан вывод, что его влияние на ФСII заключается прежде всего в воздействии на структуру светособирающей антенны (CP43 и CP47), через которую энергия возбуждения доставляется к собственно реакционному центру. В результате происходит дестабилизация молекул хлорофиллов в данной структуре и изменение их оптических и функциональных характеристик. Сходные эффекты наблюдались также в цианобактериальных комплексах ФСI. Кроме того, антисептик влиял на скорость установления равновесного распределения возбужденных состояний по спектральным формам в антенном комплексе ФСI. Обнаружено и значительное воздействие октенидина на скорость переноса электронов в комплексе ФСI: в его присутствии рекомбинация фоторазделенных зарядов между фотоактивным пигментом P700 и концевым акцептором FA/FB происходит в два раза быстрее.

Ключевые слова: фотосистемы I и II, антисептики, октенидин, флуоресценция, перенос энергии, перенос электрона.

DOI: 10.31857/S0006302924030098, EDN: OFJGYJ

Нарастающие объемы производства дезинфицирующих средств, включая четвертичные аммониевые соединения и бигуаниды, их повседневное использование в здравоохранении, пищевой промышленности, в быту ставят актуальные вопросы о биобезопасности такого рода антимикробных соединений. При этом необходимо учитывать, что в силу специфики применения, а также низкой степени биодegradации, показанной для некоторых катионных четвертичных аммониевых соединений и бигуанидов [1], такие дезин-

фектанты и антисептики могут практически в неизменном виде попадать в сточные воды, ил очистных сооружений, рассеиваться в окружающей среде и создавать загрязняющую нагрузку на экосистемы [2, 3].

Избирательное связывание катионных антимикробных агентов с клетками целевых видов бактерий и дальнейшее их деструктивное действие на плазматические бактериальные мембраны в значительной степени определяют зарядовые взаимодействия, поскольку эти мембраны характеризуются высоким содержанием отрицательно заряженных липидов, в первую очередь, фосфатидилглицерола и кардиолипина. Считается, что для проявления противомикробных свойств достаточна комбинация в молекуле силь-

Сокращения: ССК – светособирающий комплекс, РЦ – реакционный центр, ФСI – фотосистема I, ФСII – фотосистема II, Хл – хлорофилл, P700 – фотоактивный димер Хл РЦ, QA – первичный акцептор хинонной природы.

ного положительного заряда и гидрофобной области — это обеспечивает встраивание в липидный бислой плазматической мембраны [4]. Как мы ранее показали методами молекулярного моделирования, в процессе адсорбции катионных антисептиков на модельных мембранах, имитирующих плазматические мембраны бактерий по процентному содержанию различных липидов, гидрофобные фрагменты молекул оказываются погруженными в гидрофобную область бислоя, а положительно заряженные группы колокализуются с отрицательно заряженными фосфатами липидов на поверхности мембраны [5, 6]. Такие взаимодействия приводят к изменению коэффициентов латеральной диффузии мембранных липидов, влияют на параметры упорядоченности липидов и способствуют образованию пор в мембране [5, 6], что, очевидно, обеспечивает и эффективное проникновение антисептиков внутрь клеток.

Направленные против целевых видов бактерий дезинфектанты и антисептики при попадании в окружающую среду могут оказывать деструктивное воздействие на различных обитателей водоемов, илистых почв, осадков сточных вод, активного ила — в том числе, что важно, и на фотосинтезирующие организмы. У фотосинтезирующих организмов фотосинтетический аппарат, ассоциированный с системой внутриклеточных мембран, наряду с плазматической мембраной может, очевидно, представлять потенциальную мишень для действия катионных биоцидов. Так, ранее мы показали, что катионные антисептики из групп четвертичных аммониевых соединений и бигуанидов вызывают снижение эффективности преобразования световой энергии фотосинтезирующими пурпурными несерными бактериями. При этом в хроматофорах бактерий *Rhodobacter sphaeroides* снижается эффективность передачи энергии от светособирающего комплекса (ССК) LH2 к комплексу LH1 с реакционным центром (РЦ) [7], а у *Rhodospirillum rubrum*, у которых ССК LH2 отсутствует, снижается эффективность передачи энергии от ССК LH1 к РЦ [8]. Эти бактерии являются факультативно аэробными фотоорганогетеротрофными грамотрицательными бактериями, которые, осуществляя аноксигенный фотосинтез, используют в качестве доноров электронов органические соединения [9] и обитают именно в тех местах, где высока вероятность накопления дезинфектантов и антисептиков. Наблюдаемые эффекты мы связали, в том числе, с взаимодействием антисептиков с анионными фосфолипидами, которые составляют более 40% липидов фотосинтетических мембран пурпурных несерных бактерий. Это приводит к структурным изменениям липидной упаковки и нарушает оптимальные условия переноса энергии между ССК и от ССК к РЦ. Вместе с тем и са-

ми амфипатические многокомпонентные полипептидные фототрансформирующие комплексы, очевидно, могут быть мишенью для атаки катионными антисептиками.

Тилакоидные мембраны кислородвыделяющих организмов — цианобактерий и фотосинтезирующих эукариот — характеризуются высококонсервативным характером их липидного состава, который включает четыре класса глицеролипидов: нейтральные моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и отрицательно заряженные сульфохиновозилдиацилглицерин и фосфатидилглицерин [10]. В частности, в мембранах хлоропластов шпината отрицательно заряженные фосфолипиды и сульфолипиды составляют около 20%.

Тилакоидные мембраны содержат два мульти-субъединичных пигмент-белковых комплекса: фотосистема I (ФСI) и фотосистема II (ФСII), которые действуют как две последовательные фотооксидоредуктазы [11–13], и в состав которых входят те же липиды [14]. Таким образом, липидная матрица фотосинтетических мембран и у кислородвыделяющих организмов может служить мишенью для связывания молекул катионных дезинфектантов и антисептиков при их проникновении в клетки. Так, в частности, недавно показано на штаммах *Microcystis*, что широко используемый дезинфектант из группы четвертичных аммониевых соединений (бензалкония хлорид-С14) уже при концентрации 0.4 мг/л вызывает значительное подавление фотосинтетической активности этих цианобактерий [15].

В ФСII минимальный ядерный белковый ансамбль, способный к фотоокислению воды и восстановлению молекул пластохинонов, состоит из Mn_4CaO_5 кластера, двух интегральных антенных белков CP43 и CP47, фотосинтетического РЦ, содержащего D1-, D2- и цит. b_{559} -субъединицы, и периферического белка PsbO (марганец-стабилизирующей белок). Комплекс ФСII образует димер, где каждый мономер содержит одну электрон-транспортную цепь, чьи кофакторы координируются белками D1/D2. CP43 более лабильно связан с D1/D2-гетеродимером РЦ, чем CP47 и, возможно, вовлекается в стабилизацию комплекса окисления воды. В свою очередь, CP47, помимо переноса энергии, также, по-видимому, играет определенную структурную роль, способствуя теснейшей ассоциации D1- и D2-субъединиц. CP43 и CP47 содержат 13 и 16 молекул хлорофилла *a* (Хл *a*) соответственно. РЦ, в свою очередь, включает 6 молекул Хл *a* и 2 молекулы феофитина [16–18]. В растениях дополнительный светосбор обеспечивается образованием больших суперкомплексов с мембранносвязанными Хл-содержащими белками и тримерными ССК.

Мономерный цианобактериальный комплекс ФСІ с молекулярной массой >370 кДа содержит 12 различных полипептидов [19]. При этом шесть молекул Хл *a* в каталитическом ядре двух интегральных субъединиц PsaA/PsaB окружены 90 молекулами Хл *a* и 22 молекулами β -каротина, которые вместе служат основными антенными пигментами. Все эти окислительно-восстановительные кофакторы, за исключением железо-серных кластеров F_A/F_B , расположены внутри субъединиц ядра псевдосимметричным образом и образуют две ветви (А и В) для потенциального переноса электронов. Терминальные акцепторы электронов F_A и F_B связаны с внешней стромальной субъединицей PsaC.

В настоящей работе, продолжая начатое ранее изучение влияния катионных антисептиков октенидина, мирамистина, хлоргексидина и пиклоксидина на спектральные свойства и процессы трансформации энергии в хроматофорах пурпурных бактерий [7, 8], мы приводим результаты нашего исследования на изолированных из шпината активных коровых комплексах ФСІІ с интактным комплексом окисления воды и на коровых комплексах ФСІ из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кислород-выделяющие ядерные комплексы ФСІІ выделяли из свежих растений шпината (*Spinacia oleracea*) [20] путем обработки мембранных фрагментов *n*-додецил- β -*d*-мальтозидом (10:1, детергент/хлорофилл) в течение 1 ч с последующим центрифугированием на градиенте плотности сахарозы (20–40%) в течение 7 ч при 210 000 *g* с использованием вертикального ротора Beckman VTi50. Общую концентрацию Хл в образцах ФСІІ (~ 2.7 мг Хл·мл⁻¹) определяли методом, описанным в работе [21]. Среда для хранения/анализа содержала 25 мМ Mes (pH 6.5), 15 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ и 0.03% (в/о) *n*-додецил- β -*d*-мальтозида. Полученные препараты ядерных комплексов ФСІІ практически не содержат светособирающий комплекс LH2 [20]. Скорость выделения кислорода (1500–1600 мкМ O₂·(мг Хл)⁻¹·ч⁻¹) при стационарном освещении (1000 мкМ фотонов м⁻¹с⁻¹) измеряли при 23°C с помощью электрода Кларка в присутствии 0.1 мМ 2,6-дихлоробензохинона и 1.0 мМ феррицианида калия в качестве акцептора электронов.

Тилакоидные мембраны из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа выделяли по методике, описанной в работе [22]. Для получения комплексов ФСІ использовали с наилучшими модификациями процедуру экстракции, описанную в работе [23]. Для получения мем-

бранных фрагментов тилакоидные мембраны, полученные путем разрушения клеток с помощью френч-пресса и последующего ультрацентрифугирования, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в присутствии 50 мМ HEPES–NaOH (pH 7.5), содержащего 1% *n*-додецил- β -*d*-мальтозида при концентрации хлорофилла 0.5–0.6 мг/мл при 4°C. Далее суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 14000 *g*, супернатант наносили на градиент плотности сахарозы (5–20% масс./об.), приготовленный в 50 мм буфере HEPES–NaOH (pH 8.0), содержащем 0.03% (масс./об.) *n*-додецил- β -*d*-мальтозида. Градиенты центрифугировали в течение 16 ч при 140000 *g*. Нижнюю полосу собирали, дважды диализовали против 50 мМ буфера HEPES–NaOH (pH 7.5) в течение 2 ч и концентрировали. Суспензию комплексов ФСІ (2 мг·мл⁻¹) замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70°C. Поскольку изолированные комплексы ФСІ не содержат природного белка-донора цитохрома *с*₆, во всех экспериментах в качестве экзогенного донора электронов к образцу добавляли 10 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенола и 5 мМ аскорбата натрия.

Спектры поглощения регистрировали с помощью модифицированного спектрофотометра Hitachi-557 (Япония), спектры флуоресценции – с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Япония), оснащенного высокочувствительным ИК-фотоумножителем Hamamatsu 5509-72. Спектры флуоресценции регистрировали при возбуждении на длине волны 400 нм. Ширина полосы составляла 10 нм для возбуждающего света и 5 нм для регистрируемой флуоресценции. Кинетические кривые затухания флуоресценции были измерены при 680 нм с использованием системы счета одиночных фотонов с временной корреляцией TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) с гибридным фотоприемником НРМ-100-07 с чрезвычайно высокой динамикой. В качестве источника возбуждающего света использовали фемтосекундную лазерную систему «Тема-150» (ООО «Авеста-Проект», Россия). Она генерировала световые импульсы длительностью 300 фс при длине волны 400 нм (частота повторения – 80 МГц; средняя мощность излучения – 2.8 Вт; энергия одиночного импульса – 34 нДж). В экспериментах энергию возбуждающих световых импульсов уменьшали с помощью нейтральных светофильтров до уровня, определяемого чувствительностью регистрирующей системы. Средняя плотность мощности излучения составляла $3 \cdot 10^{-4}$ Вт/см². Кинетику затухания флуоресценции аппроксимировали модельной кривой в трехэкспоненциальном приближении. Времена затухания τ были рассчитаны с использованием алгоритма подбора мето-

дом наименьших квадратов с учетом инструментальной функции отклика при $\text{FWHM} \approx 16$ пс. Измерения повторяли три раза, и средние значения со стандартной ошибкой использовали для расчета времени жизни (τ) и выхода (F) флуоресценции. Все расчеты и представление были выполнены с использованием программного обеспечения Origin 8.1 (OriginLab, США).

Возбуждаемые импульсным излучением (Nd:YAG-лазер, 532 нм, 7 нс, 10 мДж) изменения поглощения ФСІ при 700 нм исследовали с помощью лабораторной системы флеш-фотолиза с двойной монохроматизацией зондирующего света [24]. Изменения поглощения во временной области от 1 мкс до 5 с были оцифрованы с помощью измерительной платы GaGe Octorpus CS8327 (Dynamic Signals, Канада). Для достижения более высокого отношения сигнал/шум было усреднено 50 одиночных сигналов. Собранные данные размером $8 \cdot 10^6$ точек были сжаты до 280 точек в логарифмической шкале времени. Кинетику восстановления P700^+ аппроксимировали суммой нескольких экспонент с помощью программ Mathematica (Wolfram Research, США) и OriginPro 9 (OriginLab, США). Концентрация хлорофилла в образцах в данных опытах составляла ~ 15 мкг/мл.

Использовали готовые фармацевтические препараты хлорексидина диглюконат 20%, пиклоксидина дигидрохлорид 0.05% (Витабакт), мирамистин 0.01% и октенидин 0.1% (Октенисепт), которые разбавляли дистиллированной водой для получения растворов антисептиков с необходимыми концентрациями. Измерения проводили при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) после 5 мин инкубации препаратов с добавленным антисептиком.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы сравнили действие четырех катионных антисептиков в концентрации 100 мкМ на флуоресценцию коровых комплексов ФСІ и ФСІІ. Было установлено, что октенидин обладает максимальной эффективностью в увеличении выхода флуоресценции, значительно превышающей действие остальных антисептиков (рис. 1). Поэтому в настоящей работе мы подробно исследовали действие именно этого антисептика.

Увеличение выхода флуоресценции в образцах ФСІІ при добавлении октенидина сопровождается коротковолновым смещением как максимума поглощения (с 672 нм до 666 нм), так и максимума флуоресценции (с 682 нм до 678 нм) (рис. 2а,б). Согласно работе [25], молекулы Хл *a* в антенных комплексах СР43 и СР47 ФСІІ шпината находятся в двух спектрально отличных формах с длинноволновым (около 680 нм) и коротковолновым (около 670 нм) максимумами поглощения. Эти

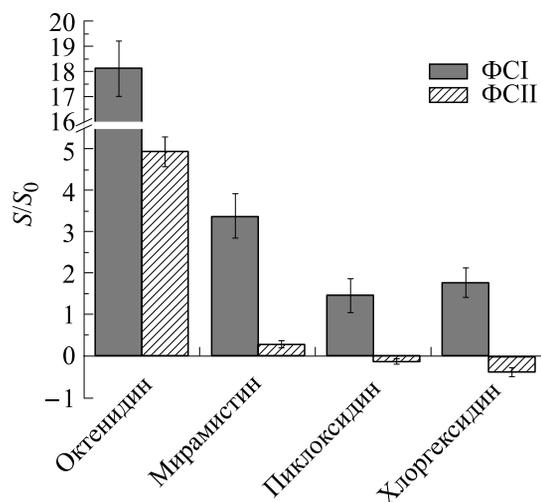


Рис. 1. Интегральная площадь S под спектром флуоресценции коровых комплексов ФСІ и ФСІІ в присутствии антисептиков (100 мкМ), нормированная на площадь S_0 под спектром флуоресценции контрольного образца без антисептика. Усреднение по трем экспериментам, указано стандартное отклонение от средней величины.

две спектральные формы, очевидно, имеют разное микроокружение и отличаются своей чувствительностью к внешним воздействиям. Так, длинноволновая форма существенно более чувствительна к нагреванию, в результате которого ее абсорбционный максимум смещается к длинам волн поглощения коротковолновой формы. Авторы считают, что температурный фактор, воздействуя на белковый носитель, нарушает исходное экситонное взаимодействие «длинноволновых» хлорофиллов, что и приводит к наблюдаемому коротковолновому смещению их максимума поглощения. Очевидно, октенидин, внедряясь в структуру светособирающих белков, может приводить к сходному эффекту.

Гипсохромный сдвиг полосы флуоресценции (рис. 2) и увеличение ее интенсивности (данные не приводятся) происходили также в присутствии детергента Тритон X-100, в связи с чем в работе мы сопоставили воздействие этих двух разных агентов на спектрально-кинетические характеристики коровых комплексов ФСІІ. Из рис. 2 также следует, что в случае ацетонового экстракта полоса поглощения в красной области и полоса флуоресценции смещаются гораздо сильнее по сравнению с контрольным образцом — максимум поглощения сдвигается до 661 нм, а максимум флуоресценции — до 673 нм. Следовательно, обработка коровых комплексов ФСІІ максимальными концентрациями октенидина и Тритона X-100 хотя и приводит к структурной пертурбации пигмент-белковых комплексов, однако частичная межхромофорная связь сохраняется. Это

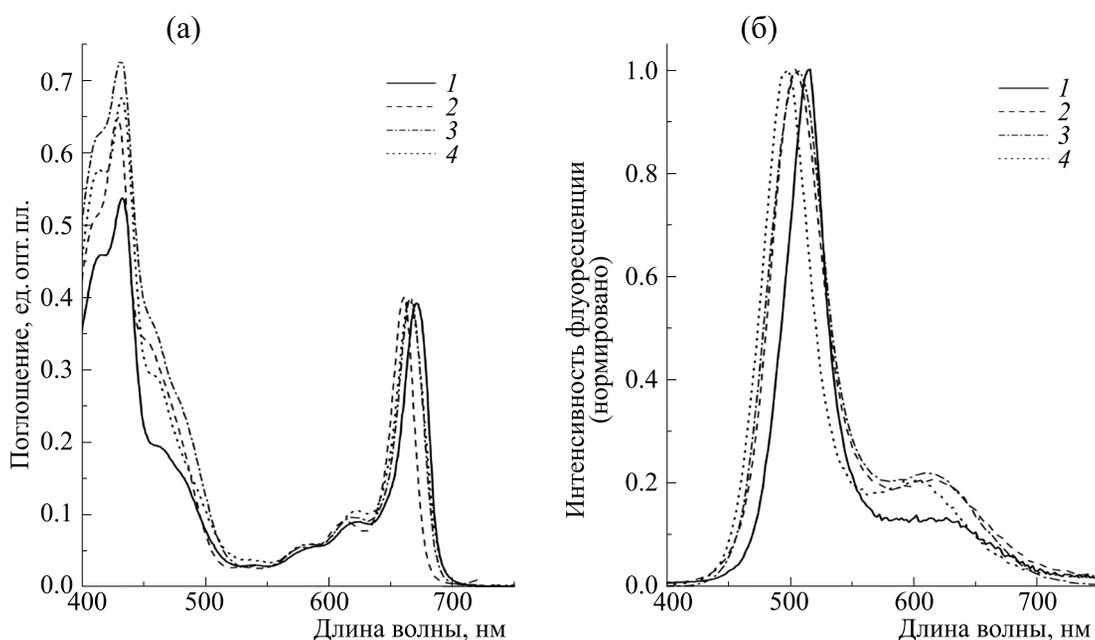


Рис. 2. Спектр поглощения (а) и нормированный спектр флуоресценции (б) коровых комплексов ФС II в контроле (спектр 1), в присутствии 300 мкМ октенидина (спектр 2), в присутствии 0.3% тритона X-100 (спектр 3) и в ацетоновом экстракте (спектр 4). Длина волны возбуждения флуоресценции 400 нм.

полностью соответствует заключению авторов работы [26] о действии агента Тритона X-100 на ФСII (коровый комплекс CP47).

Спектры поглощения и флуоресценции выделяемых нами комплексов ФСI показаны на рис. 3. Они фактически совпадают со спектрами для препаратов ФСI, приведенными в работах [27–29]: основной максимум флуоресценции локализуется при ~ 684 нм, имеет широкое плечо в красной области в районе ~ 730 нм. Как и в случае ФСII, октенидин обладал максимальной эффективностью, в несколько раз превышающей действие остальных. Это выражается как в коротковолновом сдвиге максимума спектра поглощения и флуоресценции (рис. 4, 5), так и в увеличении интенсивности флуоресценции (врезка на рис. 5). Важно отметить, что регистрируемое увеличение квантового выхода флуоресценции ФСI в присутствии октенидина хорошо совпадает для экспериментов по измерению стационарной флуоресценции (оцененного по площади под спектром) и экспериментов по измерению кинетики (оцененного по интегралу под кинетической кривой).

О нарушении процессов миграции энергии в пигмент-белковых комплексах ФСII и ФСI в присутствии антисептиков свидетельствуют также результаты измерений длительности флуоресценции образцов в этих условиях. При аппроксимации экспериментальных кинетик затухания флуоресценции ФСII мы пользовались трехэкспоненциальным приближением, дающим наи-

меньшее значение величины среднеквадратичного отклонения χ^2 . Наличие трех компонентов в кинетике затухания флуоресценции ФСII в диапазонах около 100 пс, несколько сотен пс и более отмечалось и в других работах. При этом появление и удлинение медленных компонентов связывается с закрытием РЦ ФСII и степенью этого закрытия в исследуемых образцах [30–34].

В экспериментах с ФСII к препаратам добавляли феррицианид калия в качестве экзогенного акцептора электронов для оценки степени восстановленности фотоактивного хлорофилла РЦ. Наши препараты содержали активный комплекс выделения кислорода, который может восстанавливать фотоокисляемый пигмент РЦ за время ~30 нс. Учитывая, что время между активизирующими вспышками света составляло 12.5 нс, можно было ожидать, что часть комплексов РЦ за время регистрации кинетики флуоресценции могла перейти в неактивное состояние. Оценка τ_1 , связываемого с процессом миграции энергии от коровой антенны к РЦ при условии их открытого состояния, составляет 50–80 пс [35, 36]. В наших экспериментах в образцах коровых комплексов ФСII при добавлении экзогенного акцептора электрона феррицианида калия длительность быстрого компонента τ_1 снижалась с ≈ 200 до 113 пс (табл. 1). Таким образом, феррицианид калия существенно снизил долю закрытых РЦ (возможно и полностью, а отличие τ_1 от литературных значений в 50–80 пс обусловлено

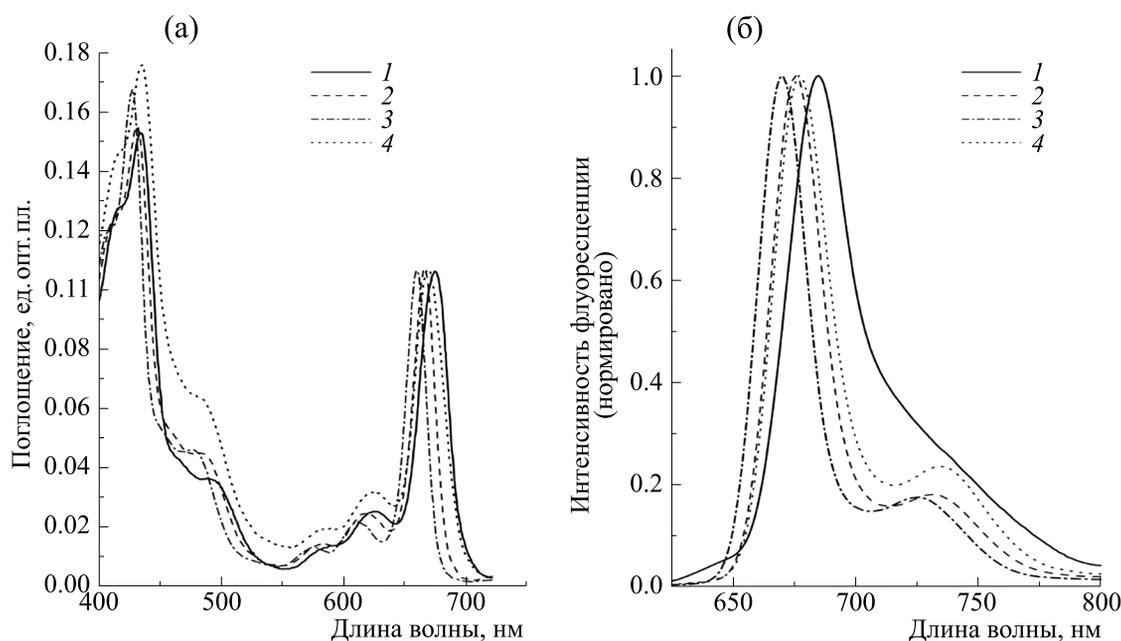


Рис. 3. Спектр поглощения (а) и нормированный спектр флуоресценции (б) коровых комплексов ФС I в контроле (спектр 1), в присутствии 150 мкМ октенидина (спектр 2), в присутствии 1% тритона X-100 (спектр 3) и в ацетоновом экстракте (спектр 4). Длина волны возбуждения флуоресценции 400 нм.

структурными особенностями нашего образца). В дальнейшем препарат, содержащий 350 мкМ феррицианида калия, считался контрольным образцом в наших экспериментах.

Из табл. 1 видно, что по мере добавления возрастающих концентраций октенидина длительность компонента τ_1 увеличивается, достигая значения 357 пс при концентрации октенидина 200 мкМ. Такое трехкратное замедление скорости миграции энергии сопровождается 6–8-кратным ростом интенсивности флуоресценции (данные не приводятся). Данное увеличение интенсивности флуоресценции объясняется значительным перераспределением вкладов (a_i) трех компонентов в кинетику затухания и увеличением длительности (τ_i) всех компонентов. По нашему мнению, такое действие октенидина на коровые комплексы ФСII связано с их деструкцией, подобно тому, как это происходит при добавлении детергента Тритона X-100. Действительно, при высоких концентрациях октенидина в трехэкспоненциальном приближении наблюдается компонент длительностью около 6 нс. Это значение близко для полученного нами времени жизни флуоресценции свободного хлорофилла в ацетоновом экстракте (6.2 нс) или для такового в дезинтегрированных пигмент-белковых комплексах в присутствии 1% Тритона X-100 (5.4 нс).

Второй компонент средней длительности, согласно многочисленным литературным данным, мы отнесли к процессу рекомбинации зарядов в

РЦ. Его длительность в контрольных образцах с феррицианидом составляет $\tau_2 = 0.37$ нс, что близко к значению 360–460 пс, полученному в работе [37]. Из табл. 1 видно, что по мере добавления октенидина значение τ_2 увеличивается до 2.28 нс, а амплитуда растет от $14 \pm 2\%$ до $33 \pm 3\%$. Такие значения находятся в хорошем соответствии с ре-

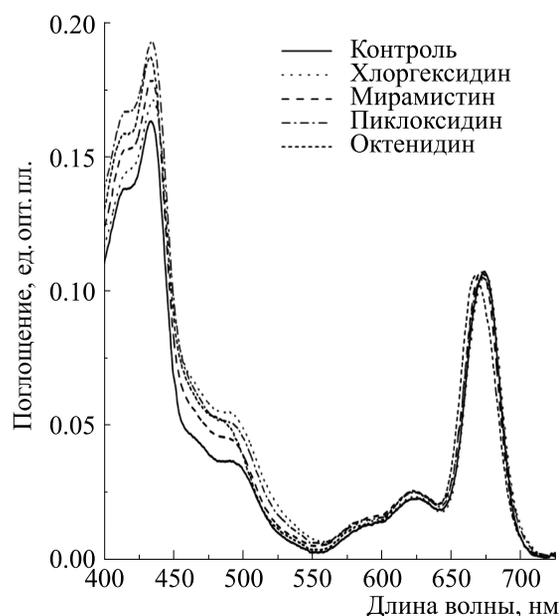


Рис. 4. Спектр поглощения комплексов ФС I в контроле и в присутствии антисептиков (100 мкМ).

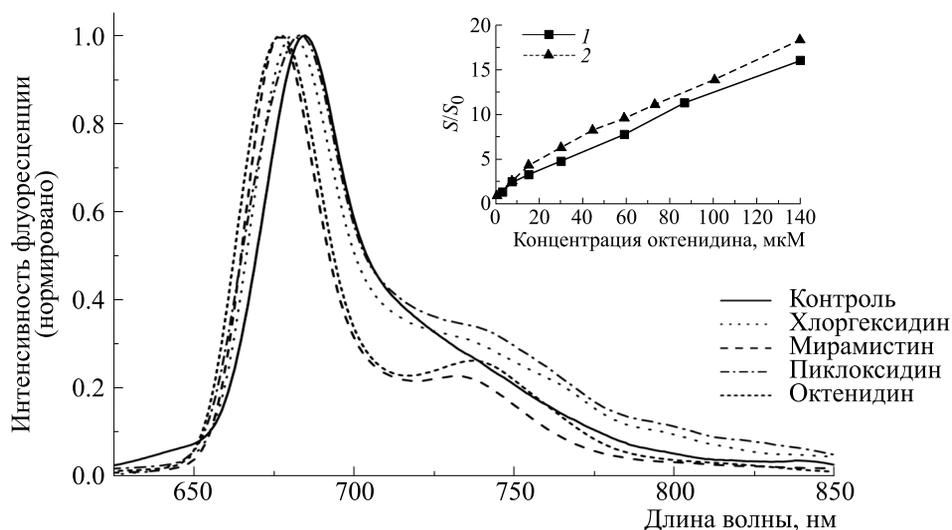


Рис. 5. Нормированный спектр флуоресценции комплексов ФС I в контроле и в присутствии антисептиков (100 мкМ). На врезке – относительное изменение квантового выхода флуоресценции комплексов ФС I в присутствии октенидина при оценке соотношения площадей под спектром флуоресценции (спектр 1) и под кинетикой затухания флуоресценции (спектр 2).

зультатами, полученными в работе [38] в образцах фотосинтетических мембран, обогащенных ФСII, и в препаратах коровых комплексов ФСII при их восстановлении дитионитом, ведущим к появлению дважды восстановленного первичного акцептора хинонной природы (Q_A); доминирующим (~ 70%) компонентом флуоресценции становится компонент с $\tau \sim 200$ пс – как и в случае, когда Q_A окислен. Этот компонент следует отне-

сти к τ_1 в нашей работе. В то же время в условиях однократно восстановленного Q_A самый быстрый компонент флуоресценции имел $\tau \sim 600$ пс (25%), а два других компонента характеризовались $\tau \sim 1.4$ нс (68%) и $\tau \sim 3.3$ нс (7%). Авторы работы [38] интерпретировали самую быструю кинетическую фазу (200 пс) как указание на высокую эффективность разделения зарядов в РЦ благодаря отсутствию электрического заряда на

Таблица 1. Времена жизни τ_i и амплитуды a_i трех компонентов флуоресценции коровых комплексов ФСII и ФС I при различных концентрациях добавленного октенидина

	τ_1 , пс	τ_2 , нс	τ_3 , нс	a_1 , %	a_2 , %	a_3 , %
ФСII (контроль)	113 ± 6	0.37 ± 0.04	1.69 ± 0.06	85 ± 5	14 ± 3	1 ± 0.4
5 мкМ октенидина	128 ± 5	0.38 ± 0.04	1.92 ± 0.07	82 ± 4	17 ± 4	1 ± 0.4
25 мкМ октенидина	270 ± 10	1.31 ± 0.05	4.46 ± 0.12	65 ± 4	21 ± 5	14 ± 3
100 мкМ октенидина	333 ± 15	2.24 ± 0.09	5.28 ± 0.11	58 ± 4	32 ± 4	10 ± 2
200 мкМ октенидина	357 ± 14	2.28 ± 0.11	6.19 ± 0.17	57 ± 5	33 ± 3	10 ± 3
ФС I (контроль)	63 ± 3	0.51 ± 0.04	2.6 ± 0.1	95.7 ± 4.4	2.6 ± 0.3	1.7 ± 0.2
7.5 мкМ октенидина	115 ± 6	0.55 ± 0.06	4.4 ± 0.2	70.0 ± 3.4	23.8 ± 0.9	6.2 ± 1.1
30 мкМ октенидина	399 ± 15	3.2 ± 0.1	5.3 ± 0.1	26.7 ± 2.4	42.0 ± 4.1	31.3 ± 3.7
90 мкМ октенидина	777 ± 18	4.3 ± 0.2	6.2 ± 0.2	14.1 ± 1.2	64.8 ± 4.2	21.1 ± 1.9
140 мкМ октенидина	922 ± 21	4.8 ± 0.3	6.2 ± 0.3	10.6 ± 1.4	66.9 ± 3.9	22.5 ± 2.4

Примечание. $\lambda_{возб} = 400$ nm, $\lambda_{рег} = 680$ nm. Указаны средние значения для трех измерений и стандартная ошибка.

Q_A . Это объясняется двойным протонированием дважды восстановленного Q_A . В наших экспериментах при различных концентрациях октенидина мы также получали значения τ_2 , близкие к результатам работы [38] для коровых комплексов ФСII с однократно восстановленным Q_A . По всей видимости, по мере роста концентрации октенидина эффективность фотохимического преобразования световой энергии в РЦ снижается, что ведет к увеличению вероятности обратной реакции переноса энергии от РЦ в антенный комплекс. Параллельно с этим процессом увеличивается доля окисленных РЦ, что сопровождается последовательным увеличением значений τ_2 и a_2 (см. табл. 1).

Основной вклад ($a_1 = 95.7\%$) в кинетику затухания флуоресценции ФСI в наших измерениях составляет самый короткоживущий компонент $\tau_1 \approx 60$ пс, который связывают с захватом энергии возбуждения от красных хлорофиллов реакционным центром (табл. 1). Следовательно, практически все молекулы Хл комплекса ФСI являются активными в плане взаимодействия с РЦ. Быстрые компоненты с $\tau < 1$ пс и ~ 15 пс, измеренные в предыдущих работах [39, 40]), мы не обнаружили, так как измерения кинетики флуоресценции проводили только на одной длине волны регистрации – 680 нм.

Относительный вклад двух наиболее медленных фаз (в контрольных образцах 0.51 нс и ~ 2.6 нс) был ничтожно мал ($\sim 4\%$). Компонент с $\tau_2 \approx 500$ пс можно связать с тем же процессом, что и τ_1 , но не в тримерных, а в мономерных комплексах [39]. Дальнейшее увеличение вклада этого компонента при добавлении антисептиков означает, что антисептики могут приводить к диссоциации трехмерных комплексов ФСI. Наиболее долгоживущий компонент кинетики затухания флуоресценции, согласно литературным данным [39], относится к части молекул антенны, не связанных с РЦ. Отсюда можно сделать вывод, что в пигмент-белковых комплексах ФСI в отсутствие миграции энергии к РЦ длительность флуоресценции светособирающих молекул Хл составляет ~ 2.6 нс, константа скорости внутримолекулярной дезактивации $k_f + k_\Sigma = 4 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$. Здесь k_f является константой скорости флуоресценции Хл, k_Σ означает сумму констант скоростей безизлучательных процессов дезактивации. Отметим, что амплитуда этого компонента незначительна и составляет лишь 1.65%. Иными словами, в несвязанном с РЦ состоянии в контрольном препарате находится лишь несколько молекул Хл.

Ранее авторы работы [41] для ФСII в тилакоидной мембране ввели понятие фактора « k_{EET} », который зависит от структуры комплекса и описы-

вает связь антенных комплексов ФСII с РЦ в терминах эффективности переноса энергии. В предельных случаях $k_{EET} = 1$ для случая максимальной связи антенны и РЦ и $k_{EET} = 0$ для несвязанных комплексов антенны и РЦ в смысле переноса энергии. В нашем случае будем считать, что для подавляющего количества молекул антенны в комплексах ФСI ($\tau_1 = 63$ пс) величина $k_{EET} = 1.0$, а для несвязанных молекул Хл $k_{EET} = 0$. Тогда для оставшихся молекул ($\tau_2 = 0.45$ нс) фактор $k_{EET} = 0.11$. Отсюда следует, что светособирающие пигменты фотосинтезирующих организмов вступают по крайней мере в два типа взаимодействий: 1) пигмент-белковые взаимодействия пигментов со структурными белками антенны и 2) взаимодействие пигмент-белковых комплексов с комплексами РЦ в плане переноса энергии (factor of “connectivity”) [41].

При добавлении наиболее активного антисептика октенидина в возрастающих концентрациях длительность самого короткого компонента постепенно возрастает от 63 пс до ~ 922 пс (табл. 1). При этом амплитуда этого компонента уменьшается от 95.7% до 10.6%; амплитуды τ_2 и τ_3 , наоборот, возрастают. Это может говорить о том, что под действием октенидина происходит уменьшение доли эффективно взаимодействующих антенных хлорофиллов с РЦ и одновременное увеличение доли слабо связанных либо вообще не связанных с РЦ комплексов. Таким образом, одной из мишеней октенидина является эффективность взаимодействия ССК–РЦ (фактор k_{EET}). Увеличение τ_2 и τ_3 до ~ 5 –6 нс (значение τ_{fl} свободного Хл) указывает на то, что другой мишенью для октенидина является эффективность Хл-белковых взаимодействий. Другими словами, связь молекул Хл с белковым носителем в антенных комплексах ослабевает под действием антисептика, и с ростом концентрации агента молекулы Хл приобретают свойства свободного Хл.

Выше мы отметили, что действие октенидина в общих чертах аналогично действию детергента Тритон X-100. Это справедливо по отношению и к ФСII, и к ФСI. На рис. 3 показаны нормированные спектры поглощения и флуоресценции контрольных препаратов ФСI, а также спектры в присутствии октенидина, Тритона X-100 и ацетона. В последнем случае мы имеем раствор экстрагированного хлорофилла. Хорошо видно, что спектры поглощения и флуоресценции препаратов в присутствии октенидина и Тритона X-100 хорошо совпадают, в то время как ацетоновый экстракт демонстрирует гораздо большее коротковолновое смещение как максимума полосы поглощения, так и максимума полосы спектра флуоресценции. Однако, судя по времени жизни флуоресценции, которое для препарата в присут-

ствии 1% Тритона X-100 совпадает с таковым для экстракта, детергент полностью мономеризует пигментный аппарат ФСІ. Некоторое различие в спектрах является, очевидно, следствием оставшегося взаимодействия хлорофиллов с белковой матрицей, которое в ацетоне полностью утрачено.

Мы также исследовали влияние октенидина на процесс темнового восстановления фотоокисленного димера Хл РЦ ($P700^+$) после активации препаратов единичными вспышками света. Напомним, что использованные в настоящей работе образцы ФСІ содержали в качестве экзогенного донора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенол в концентрации 10 мкМ и 5 мМ аскорбата натрия. Кинетика темнового восстановления $P700^+$ в общих чертах хорошо совпадает с таковой, наблюдавшейся ранее на аналогичном препарате ФСІ цианобактерий для случая низкой интенсивности возбуждающего импульса (рис. 5 в работе [42]). В контроле, как и присутствии октенидина, кинетика восстановления $P700^+$ хорошо описывается двумя экспонентами. Опираясь на известные литературные данные, можно предположить, что на шкале десятков-сотен миллисекунд фотоокисленный димер $P700^+$ в темноте получает электрон либо в обратной реакции от конечного акцептора (F_A/F_B)⁻ ($\tau_1 \sim 54$ мс), либо от экзогенного донора 2,6-дихлорфенолиндофенола-Н₂ ($\tau_2 \sim 520$ мс). При увеличении концентрации антисептика до 110 мкМ происходит уменьшение времени быстрого компонента до 25 мс и увеличение его вклада с 37 до 76%, а также соответствующее уменьшение вклада медленного компонента при сокращении его τ_2 до 220 мс.

Поскольку прямые реакции переноса электрона много быстрее обратных, можно использовать экспериментально измеряемую величину относительного вклада быстрого компонента τ_1 для расчета заселенности электронами акцептора (F_A/F_B)⁻ (α): $\alpha = K_1/(K_1 + K_2)$, где K_1 – константа обратного переноса электрона от (F_A/F_B)⁻ на $P700^+$, а K_2 – константа скорости переноса электрона от (F_A/F_B)⁻ в среду на кислород или окисленную форму аскорбата. Если взять экспериментально полученные значения $\alpha = 0.37$ и $K_1 = 18.5$, то из рассчитанного значения константы K_2 для контроля получаем величину $\tau = 32$ мс. Можно считать, что это значение является характеристическим временем переноса электрона с терминального акцептора (F_A/F_B)⁻ в среду. При концентрации октенидина 110 мкМ расчетное время переноса электрона от (F_A/F_B)⁻ в среду увеличивается от 32 мс до 79 мс. В этих условиях время обратного переноса электрона (F_A/F_B)⁻ на

$P700^+$ уменьшается от 54 мс до 25 мс. Иными словами, в присутствии октенидина электрон с (F_A/F_B)⁻ быстрее возвращается назад на $P700^+$ и медленнее уходит во внешнюю среду. При этом скорость восстановления $P700^+$ от экзогенного донора возрастает более чем в два раза. Мы не знаем точных механизмов действия октенидина на процессы темнового восстановления $P700^+$, но можно предположить, что и здесь проявляются его свойства поверхностно-активного соединения. Разрыхление пигментной матрицы вызывает не только нарушение взаимодействия между порфиринами, но и открывает больший доступ для проникновения молекул красителя (2,6-дихлорфенолиндофенол-Н₂) к сайту РЦ на люминальной стороне ФСІ, что приводит к увеличению скорости донирования электрона на $P700^+$. В то же время, на стромальной стороне нарушается стабилизация электрона на терминальном кластере (F_A/F_B)⁻, в результате чего растет скорость обратного транспорта.

Октенидин влияет и на функциональные свойства кислородвыделяющего комплекса ФСІІ. Исследование воздействия октенидина на стационарную активность выделения кислорода в коровом комплексе ФСІІ показало, что скорость выделения кислорода снизилась с 1500 (в контрольном образце) до 560 и 230 мкМ О₂·(мг хлора·ч)⁻¹ в присутствии 50 мкМ и 100 мкМ октенидина соответственно (данные не приводятся).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из результатов исследования, основным эффектом, связанным с воздействием антисептиков, особенно октенидина, является существенное увеличение длительности флуоресценции и интенсивности свечения антенных хлорофиллов в исследуемых образцах. Очевидно, что октенидин в препаратах воздействует по меньшей мере на две явные мишени. Одной из них является взаимодействие антенных комплексов с реакционными центрами (связность, как описано в работе [41]). Нарушение эффективности такого взаимодействия приводит к увеличению как интенсивности (ϕ), так и времени жизни флуоресценции (τ) антенны. По эффективности влияния на величины ϕ и τ комплексов ФСІІ и ФСІ исследованные антисептики располагаются в следующем ряду: октенидин, мирамистин, хлоргексидин, пиклоксидин. Другой мишенью воздействия антисептиков является эффективность взаимодействия Хл с белковым носителем. Следствием последнего эффекта антисептика является появление свободных молекул Хл, длительность флу-

оресценции которых близка к t_{fl} свободных молекул пигмента.

В дополнение к двум упомянутым мишеням действия октенидина при изучении комплексов ФСИ мы обнаружили, что этот агент также замедляет скорость миграции энергии экситонов в антенном комплексе ФСИ. Эти комплексы содержат длинноволновую и коротковолновую формы молекул Хл в соотношении 90:2 [39]. При активации образцов при 400 нм возбуждение красных форм Хл происходит, главным образом, за счет миграции энергии от коротковолновых форм Хл. В этом случае скорость разгорания флуоресценции акцептора определяется скоростью миграции энергии из коротковолновой формы Хл [43]. Таким образом, изменение скорости миграции энергии будет отражено в изменении времени нарастания переднего фронта сигнала флуоресценции акцептора энергии. В наших предварительных экспериментах мы обнаружили, что при концентрации октенидина 140 мкМ крутизна переднего фронта кинетики флуоресценции увеличивается в ~2 раза (данные не приводятся). Следовательно, в присутствии 140 мкМ октенидина скорость миграции энергии от коротковолновых форм Хл к длинноволновым в антенном комплексе корового комплекса ФСИ замедляется в ~2 раза. Очевидными причинами такого явления могут являться пертурбации спектров поглощения и флуоресценции образцов, ориентационные эффекты, изменение межмолекулярных расстояний. Детальное раскрытие истинных причин замедления скорости миграции энергии в комплексах ФСИ при добавлении антисептиков требует дальнейшего исследования.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют, что катионные антисептики (особенно октенидин) могут значительно влиять на процессы преобразования световой энергии ключевыми фототрансформирующими комплексами ФСИ и ФСИ, входящими в состав фотосинтетического аппарата цианобактерий, водорослей, высших растений. Поэтому такие антисептики, прежде всего — октенидин, следует использовать с определенной степенью осторожности. Широкое бесконтрольное их применение, а также бесконтрольное уничтожение накопленных препаратов после истечения срока годности может оказывать отрицательное воздействие на окружающую среду.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (проект № 121032500058-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawrence J. R., Zhu B., Swerhone G. D. W., Topp E., Roy J., Wassenaar L. I., Rema T., and Korber D. R. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3541 (2008) DOI: 10.1128/AEM.02879-07
2. Östman M., Lindberg R. H., Fick J., Björn E., and Tysklind M. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Res.*, **115**, 318 (2017). DOI: 10.1016/j.watres.2017.03.011
3. Jesus F. T., Oliveira R., Silva A., Catarino A. L., Soares A. M. V. M., Nogueira A. J. A., and Domingues I. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*, **22**, 1348–1358 (2013). DOI: 10.1007/s10646-013-1121-6
4. Gilbert P. and Moore L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 703 (2005). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x
5. Kholina E. G., Kovalenko I. B., Bozdaganyan M. E., Strakhovskaya M. G., and Orekhov P. S. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8593 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c07212
6. Kholina E., Bozdaganyan M., Strakhovskaya M., and Kovalenko I. Interaction of cationic antiseptics with cardiolipin-containing model bacterial membranes. *Med. Extrem.*, **3**, 36 (2021).
7. Strakhovskaya M. G., Lukashev E. P., Korvatovskiy B. N., Kholina E. G., Seifullina N. Kh., Knox P. P., and Paschenko V. Z. The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.*, **147**, 197–209 (2021). DOI: 10.1007/s11120-020-00807-x
8. Knox P. P., Lukashev E. P., Korvatovskiy B. N., Strakhovskaya M. G., Makhneva Z. K., Bol'shakov M. A., and Paschenko V. Z. Disproportionate effect of cationic antiseptics on the quantum yield and fluorescence lifetime of bacteriochlorophyll molecules in the LH1-RC complex of *R. rubrum* chromatophores. *Photosynth. Res.*, **153**, 103–112 (2022). DOI: 10.1007/s11120-022-00909-8
9. McEwan A. G. Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototro-

- phic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**(1–3), 151–164 (1994). DOI: 10.1007/BF00871637
10. Reszczyńska E. and Hanaka A. Lipids composition in plant membranes. *Cell Biochem. Biophys.*, **78**, 401–414 (2020). DOI: 10.1007/s12013-020-00947-w
 11. *Photosystem I: the light-driven plastocyanin: ferredoxin-oxido-reductase*. Ed. by J. H. Golbeck (Springer, New York, 2006).
 12. Kern J. and Renger G. Photosystem II: Structure and mechanism of the water:plastoquinone oxidoreductase. *Photosynth. Res.*, **94**, 183–202 (2007). DOI: 10.1007/s11120-007-9201-1
 13. Teodor A. H. and Bruce B. D. Putting photosystem I to work: truly green energy. *Trends Biotechnol.*, **38**, 1329 (2020). DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.04.004
 14. Kobayashi K., Yoshihara A., and Kubota-Kawai H. Evolutionary implications from lipids in membrane bilayers and photosynthetic complexes in cyanobacteria and chloroplasts *J. Biochem.*, **174**, 399 (2023). DOI: 10.1093/jb/mvad058
 15. Jia Y., Huang Y., Ma J., Zhang S., Liu J., Li T., and Song L. Toxicity of the disinfectant benzalkonium chloride (C14) towards cyanobacterium *Microcystis* results from its impact on the photosynthetic apparatus and cell metabolism. *J. Environ. Sci. (China)*, **135**, 198 (2024). DOI: 10.1016/j.jes.2022.11.007
 16. Grotjohann I., Jolley C., and Fromme P. Evolution of photosynthesis and oxygen evolution: Implications from the structural comparison of photosystems I and II. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4743 (2004). DOI: 10.1039/B408980D
 17. Krausz E., Hughes J. L., Smith P., Pace R. and Årsköld S. P. Oxygen-evolving photosystem II core complexes: a new paradigm based on the spectral identification of the charge-separating state, the primary acceptor and assignment of low-temperature fluorescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **4**, 744–753 (2005). DOI: 10.1039/b417905f
 18. Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., and Biesiadka J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, **438**, 1040 (2005). DOI: 10.1038/nature04224
 19. Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., and Krauß N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909 (2001). DOI: 10.1038/35082000
 20. Haag E., Irrgang K. D., Boekema E. J., and Renger G. Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 47 (1990). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15458.x
 21. Porra R. J., Thompson W. A., and Kriedemann P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384 (1989). DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0
 22. Smart L., Anderson S., and McIntosh L. Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J.*, **10**, 3289 (1991). DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04893.x
 23. Shen G., Zhao J., Reimer S. K., Antonkine M. L., Cai Q., Weiland S. M., Golbeck J. H., and Bryant D. A. Inactivation of the *Ruba* gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Pcc 7002 causes a loss of photosystem I activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20343 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M201103200
 24. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Slutskaya E. A., Stepanov A. V., Argentova-Stevens A. M., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Slatinskaya O. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components. *Sci. Rep.*, **7**, 15548 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-15520-4
 25. Shan J., Wang J., Ruan X., Li L., Gong Y., Zhao N., and Kuang T. Changes of absorption spectra during heat-induced denaturation of photosystem II core antenna complexes CP43 and CP47: revealing the binding states of chlorophyll molecules in these two complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 396 (2001). DOI: 10.1016/S0005-2728(00)00270-X
 26. de Paula J. C., Liefshitz A., Hinsley S., Lin W., Chopra V., Long K., Williams S. A., Betts S., and Yocum C. F. Structure-function relationships in the 47-kDa antenna protein and its complex with the photosystem II reaction center core: insights from picosecond fluorescence decay kinetics and resonance Raman spectroscopy *Biochemistry*, **33**, 1455 (1994). DOI: 10.1021/bi00172a023
 27. Turconi S., Kruij J., Schweitzer G., Rogner M., and Holzwarth A. R. A comparative fluorescence kinetics study of photosystem I monomers and trimers from *Synechocystis* PCC 6803 *Photosynth. Res.*, **49**, 263 (1996). DOI: 10.1007/BF00034787
 28. Cherubin A., Destefanis L., Bovi M., Perozeni F., Bargigia I., Valbuena G. de la Cruz, D'Andrea C., Romeo A., Ballottari M., and Perduca M. Encapsulation of photosystem I in organic microparticles increases its photochemical activity and stability for *ex vivo* photocatalysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **7**, 10435 (2019). DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00738
 29. Toporik H., Khmel'nitskiy A., Dobson Z., Riddle R., Williams D., Lin S., Jankowiak R., and Mazor Y. The structure of a red-shifted photosystem I reveals a red site in the core antenna. *Nat. Commun.*, **11**, 5279 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-18884-w
 30. Haehnel W., Holzwarth A. R., and Wendler J. Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in the antenna chlorophylls of green algae. *Photochem. Photobiol.*, **37**, 435 (1983). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04497.x
 31. Karukstis K. K. and Sauer K. Organization of the photosynthetic apparatus of the chlorina-f2 mutant of barley using chlorophyll fluorescence decay kinetics. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **766**, 148 (1984). DOI: 10.1016/0005-2728(84)90226-3
 32. Moya I., Hodges M., and Barbet J.-C. Modification of room-temperature picosecond chlorophyll fluores-

- cence kinetics in green algae by photosystem II trap closure. *FEBS Lett.*, **198**, 256 (1986). DOI: 10.1016/0014-5793(86)80416-1
33. Hodges M. and Moya I. Time-resolved chlorophyll fluorescence studies on pigment-protein complexes from photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **935**, 41 (1988). DOI: 10.1016/0005-2728(88)90106-5
34. Keuper H. J. K. and Sauer K. Effect of photosystem II reaction center closure on nanosecond fluorescence relaxation kinetics. *Photosynth. Res.*, **20**, 85 (1989). DOI: 10.1007/BF00028623
35. Haehnel W., Holzwarth A. R., and Wendler J. Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in the antenna chlorophylls of green algae. *Photochem. Photobiol.*, **37**, 435 (1983). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04497.x
36. van der Weij-de Wit C. D., Dekker J. P., van Grondelle R., and van Stokkum I. H. M. Charge separation is virtually irreversible in photosystem II core complexes with oxidized primary quinone acceptor. *J. Phys. Chem. A*, **11**, 3947 (2011). DOI: 10.1021/jp1083746
37. Andrizhivskaya E. G., Frolov D., van Grondelle R., and Dekker J. P. On the role of the CP47 core antenna in the energy transfer and trapping dynamics of photosystem II. *Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4810 (2004). DOI: 10.1039/B411977K
38. van Mieghem F. J. E., Searle G. F. W., Rutherford A. W. and Schaafsma T. J. The influence of the double reduction of Q_A on the fluorescence decay kinetics of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**, 198 (1992). DOI: 10.1016/0005-2728(92)90082-D
39. Gobets B., van Stokkum I. H. M., Rögner M., Kruij J., Schlodder E., Karapetyan N. V., Dekker J. P., and van Grondelle R. Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: a unified compartmental model. *Biophys. J.*, **81**, 407 (2001). DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75709-8
40. Byrdin M., Rimke I., Schlodder E., Stehlik D., and Roelofs T. A. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophys. J.*, **79**, 992 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76353-3
41. Steffen R., Kelly A. A., Huyer J., Dormann P., and Renger G. Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content. *Biochemistry*, **44**, 3134 (2005). DOI: 10.1021/bi048465f
42. Vassiliev I. R., Jung Y.-S., Mamedov M. D., Semenov A. Yu., and Golbeck J. H. Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in photosystem I. *Biophys. J.*, **72**, 301 (1997). DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78669-7
43. Gvozdev D. A., Lukashev E. P., Gorokhov V. V., and Paschenko V. Z. Photophysical properties of upconverting nanoparticle-phthalocyanine complexes. *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 911 (2019). DOI: 10.1134/S0006297919080078

The Effect of Cationic Antiseptics on Spectral Characteristics and Electron Transport in Isolated Photosynthetic Complexes of Photosystems I and II

V.Z. Pashchenko*, E.P. Lukashev*, M.D. Mamedov**, D.A. Gvozdev*, B.N. Korvatovsky*, P.P. Knox*, and M.G. Strahovskaya*

*Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia

**A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/40, Moscow, 119992 Russia

The effects of cationic antiseptics (used in micromolar concentrations) on active PS II core complexes isolated from spinach plants with an intact water oxidation complex and on PS I core complexes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 were studied. Out of the antiseptics studied (miramistin, chlorhexidine, octenidine and picloxidine) octenidine had the greatest effect. It was concluded that it exerts its action on PS II primarily through the influence on the structure of the light-harvesting antenna (CP43 and CP47) that deliver excitation energy to the reaction center. As a result, the chlorophyll molecules in this structure are destabilized and their optical and functional characteristics change. Similar effects were also observed in cyanobacterial PS I complexes. In addition, the antiseptic influenced the rate of the establishment of the equilibrium distribution of excited states across spectral forms in the antenna complex of PS I. A significant effect of octenidine on the electron transfer rate in the PS I complex was also found: in its presence, the recombination of photo-separated charges between the photoactive pigment P700 and the terminal acceptor F_A/F_B occurs twice as fast.

Keywords: photosystems I and II, antiseptics, octenidine, fluorescence, energy transfer, electron transfer

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ПЛАСТОХИНОНА *in vivo* И *in vitro*

© 2024 г. Д.В. Ветошкина*, А.А. Николаев*, М.М. Борисова-Мубаракшина*.*#

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
«Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия*

*E-mail: mubarakshinamm@gmail.com

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Пластохинон – мобильный переносчик электронов от фотосистемы II к цитохромному b_6/f -комплексу в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Кроме того, пластохинон, как и многие другие изопреноиды, выполняет антиоксидантную функцию, участвуя в защите растительных клеток от активных форм кислорода. В обзоре представлены реакции взаимодействия пластохинона с такими активными формами кислорода, как синглетный кислород, супероксидный анион-радикал и пероксид водорода в хлоропластах высших растений. Наряду с этим проанализировано большое количество исследований, посвященных изучению влияния различных стрессовых факторов на биосинтез пластохинона и обнаружено, что практически во всех стрессовых условиях увеличивается содержание пластохинона. Таким образом, усиление биосинтеза пластохинона является одним из факторов, обеспечивающих устойчивость растений, что необходимо для защиты фотосинтетического аппарата от окислительной деструкции. Отдельная глава посвящена описанию методов создания растений с повышенным содержанием пластохинона и оценке их устойчивости к действию факторов среды. Кроме того, с учетом высокой антиоксидантной активности пластохинона и его способности к диффузии в липидной фазе, обсуждаются способы практического применения растительного пластохинона в качестве протектора мембранных структур от окисления.

Ключевые слова: пластохинон, активные формы кислорода, антиоксиданты, устойчивость, высшие растения.

DOI: 10.31857/S0006302924030108, EDN: OFELZG

Действие различных стрессовых факторов на растения приводит к повышению скорости генерации активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках [1, 2]; продукция АФК увеличивается не только в хлоропластах, но и в пероксиосомах [3], и в митохондриях [4], а также в плазматической мембране [5, 6]. Поэтому регулирование уровня АФК в клетках растений с целью предотвращения возникновения окислительного стресса в стрессовых условиях является одним из важнейших механизмов в системе защиты растений. Содержание АФК регулируется антиоксидантными системами, как ферментативной, так и неферментативной природы (см. обзор [7]), роль которых заключается в нейтрализации АФК.

В хлоропластах при освещении генерация АФК происходит с наибольшими скоростями, при этом именно в этих органеллах образуются практически все известные АФК, включая синглетный кислород (1O_2), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet -}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксидный радикал (OH^{\bullet}), пероксидный радикал (ROO^{\bullet}) и др. Было обнаружено, что в стрессовых условиях увеличение генерации $O_2^{\bullet -}$ и H_2O_2 в хлоропластах происходит не в водной фазе (строме хлоропласта), количество антиоксидантов в которой велико (аскорбат/аскорбатпероксидаза, глутатион, супероксиддисмутаза, циспероксиредокси н и др.), а в тилакоидной мембране, в которой расположена фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (ФЭТЦ) [8–10]. В тилакоидных мембранах антиоксидантную функцию могут выполнять токоферол и каротиноиды – представители класса изопреноидов, которые

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь, ПХ – пластохинон, ПХН2 – пластогидрохинон (двукратно восстановленный пластохинон), КС – ксантин, КСО – ксантиноксидаза, SPS – соланезилдифосфатсинтаза, VTE1 – токоферолциклаза.

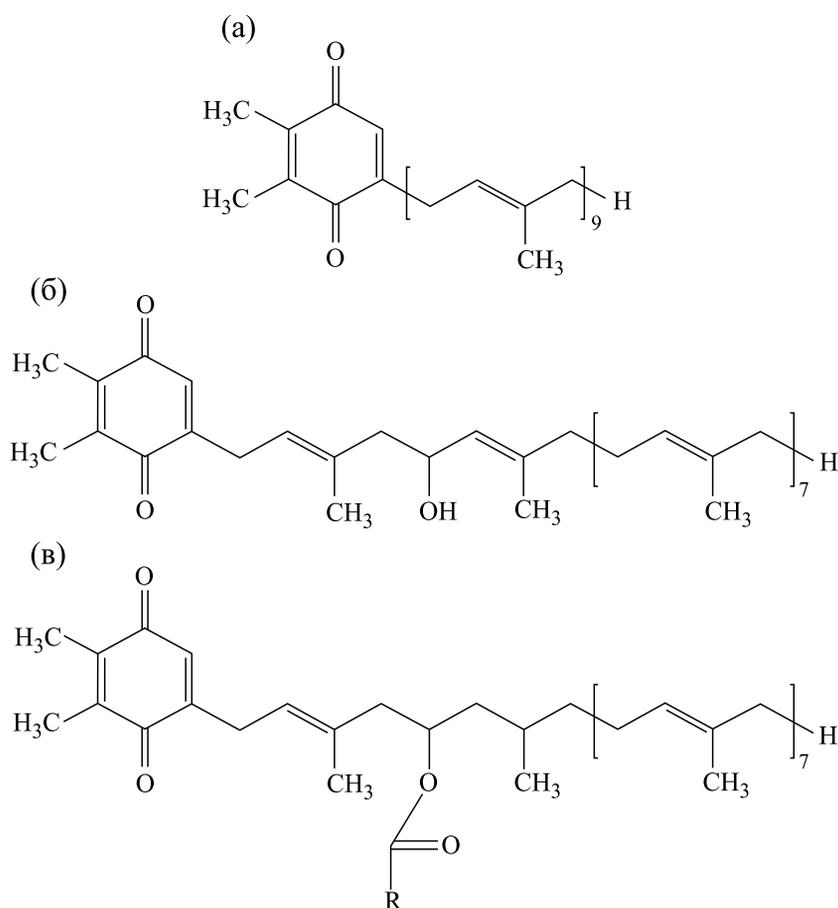


Рис. 1. Структурные формулы пластохинона А (а), пластохинона С (б) и пластохинона В (в).

нейтрализуют преимущественно $^1\text{O}_2$; токоферол способен нейтрализовать и $\text{O}_2^{\bullet-}$, но с меньшей скоростью, чем $^1\text{O}_2$ ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [11] по сравнению с $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [12] соответственно).

Главная роль в нейтрализации $\text{O}_2^{\bullet-}$ в тилакоидной мембране принадлежит другому соединению изопреноидного ряда – пластохинону (пластохинон А или пластохинон-9, рис. 1а) – мобильному липофильному переносчику электронов в ФЭТЦ [1]. Пластохинон (ПХ), по сравнению с каротиноидами и токоферолом, способен к диффузии в мембране, что позволяет ему реагировать с АФК на разных участках ФЭТЦ, где происходит их образование. Антиоксидантную активность пластохинон проявляет главным образом в восстановленной форме – в форме пластогидрохинона (ПХН₂).

В настоящем обзоре более детально представлены механизмы антиоксидантной активности пула пластохинона; суммируются новые полученные авторами обзора, а также литературные данные о взаимодействии ПХН₂ с $\text{O}_2^{\bullet-}$ [13–16].

Описаны реакции взаимодействия ПХН₂ с $^1\text{O}_2$ по физическому и химическому механизмам [17]. Известно, что и в результате реакций ПХН₂ с $\text{O}_2^{\bullet-}$ и ПХН₂ с $^1\text{O}_2$ конечным продуктом выступает H_2O_2 . Однако неоднократно показано, что при повышенной генерации $^1\text{O}_2$ в хлоропластах растений происходит окислительная модификация боковой изопреноидной цепи пластохинона, приводящая к появлению гидроксипластохинона (пластохинон С, рис. 1б); пластохинон С, согласно литературным данным, также может являться продуктом реакции ПХН₂ с $^1\text{O}_2$ [18]. Дальнейшее окисление пластохинона С ведет к образованию сложных эфиров пластохинона и жирных кислот, т.е. пластохинона В (рис. 1в). В обзоре обсуждаются особенности протекания реакций компонентов пула ПХ с $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^1\text{O}_2$, приводятся константы скоростей этих реакции и анализируется роль этих реакций в функционировании растений.

Кроме того, в обзоре представлены данные о том, что ПХН₂ может реагировать с H_2O_2 , но с

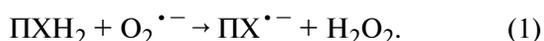
меньшими скоростями [19], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов [20–23].

В обзоре отдельно обсуждается влияние роста и развития растений, и стрессовых факторов на содержание пластохинона в растительных клетках. Показано, что при действии практически всех изучаемых стрессовых условий, как биотической, так и абиотической природы, а также по мере взросления листьев происходит накопление пластохинона в клетках [22, 24], при этом может происходить как изменение количества окисленного и восстановленного пластохинона, так и изменение распределения пластохинона между тилакоидной мембраной и пластоглобулами [25].

В финальной части обзора приведены примеры растений с измененным биосинтезом пластохинона; при этом детально описан путь биосинтеза пластохинона в клетках растений, представлены гены, изменение экспрессии которых приводит к увеличению содержания пластохинона, и описывается устойчивость таких растений к стрессовым факторам [26, 27]. Кроме того, обсуждаются способы практического применения аналогов пластохинона в качестве терапевтических агентов, обладающих противовоспалительными, противораковыми, антибактериальными, противогрибковыми и др. свойствами.

РЕАКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ПУЛА ПЛАСТОХИНОНА С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

Способность хинонов в восстановленной форме взаимодействовать с $O_2^{\bullet-}$ была продемонстрирована в работе [28], в которой константа скорости реакции второго порядка для этой реакции в водной фазе была измерена и составила $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Позднее первые свидетельства о протекании реакции PXH_2 с $O_2^{\bullet-}$ в тилакоидах были представлены в работе [29]; в результате этой реакции происходит образование пластосемихинона $PX^{\bullet-}$ и H_2O_2 (реакция 1).



В работе [30] высказано предположение, что основным поставщиком $O_2^{\bullet-}$ для реакции PXH_2 с $O_2^{\bullet-}$ служит фотосистема I, поскольку именно она является основным участком генерации $O_2^{\bullet-}$ в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. В работах М.А. Козулевой с соавторами ([31], для обзора см. работу [32]) было показано, что в условиях высокой интенсивности света главным источником $O_2^{\bullet-}$ в тилакоидной мембране выступает внутримембранный кофактор фотосисте-

мы I – восстановленный филлохинон, т.е. филлосемихинон.

Позднее Б.Н. Иванов с соавторами [14] при исследовании окисления пула ПХ в изолированных тилакоидах после выключения света показали, что окисление этого пула характеризуется двухфазной кинетикой, состоящей из быстрой и медленной фаз. Эксперименты проводили в аэробных и анаэробных условиях; в анаэробных условиях окисление пула ПХ практически не наблюдали, так же как и в ряде других работ [33, 34]. В аэробных условиях чем выше была интенсивность действующего света, т.е. чем выше была скорость генерации $O_2^{\bullet-}$, тем более выражена была быстрая фаза окисления пула ПХ. На основе полученных данных было высказано предположение, что первая быстрая фаза окисления пула ПХ может включать в себя окисление PXH_2 супероксидным анион-радикалом.

Прямые доказательства протекания реакции PXH_2 с $O_2^{\bullet-}$ в тилакоидах были представлены в исследованиях [15, 16]. Учитывая, что протекание данной реакции приводит к окислению пула ПХ, в этих работах оценивали уровень окисления пула при подаче $O_2^{\bullet-}$ к тилакоидной мембране. Оценку проводили с помощью измерения флуоресценции хлорофилла *a* фотосистемы II при комнатной температуре (см. ниже); в качестве источника $O_2^{\bullet-}$ использовали ксантин (КС)–ксантинооксидазную (КСО) систему. Атомы кислорода бензохинонового кольца PXH_2 способны к формированию водородных связей с молекулами H_2O около поверхности тилакоидной мембраны на границе фаз мембрана/вода [35]. Такое расположение бензохиноновой части молекулы PXH_2 в тилакоидной мембране предполагает протекание реакции PXH_2 с $O_2^{\bullet-}$ именно на границе фаз. Генерация $O_2^{\bullet-}$ в реакции КС (выделенного из коровьего молока) с молекулярным кислородом, катализируемой КСО, при контакте КСО с поверхностью мембраны, должна привести к тому, что часть $O_2^{\bullet-}$ будет продуцироваться вблизи молекул PXH_2 , Оригинальный подход был использован в работе [15]: для обеспечения контакта КСО с поверхностью мембраны использовали не свежеизолированные тилакоиды, а так называемые «состаренные» тилакоиды, выдержанные в течение 24–48 ч во льду; при этом КСО в течение нескольких минут инкубировали в среде с тилакоидами до начала измерений.

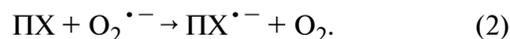
Для оценки влияния $O_2^{\bullet-}$ на уровень восстановления пула ПХ были применены три подхода: 1) измерение флуоресценции хлорофилла *a* при постоянном освещении (100 и 200 мкмоль кван-

тов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$) с помощью флуориметрии с пульс-амплитудной модуляцией (ПАМ-флуориметрии) и определение величины $1-qP$ [36] и $1-qL$ [37], т.е. относительного уровня восстановления пула ПХ на свету; 2) измерение индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* высокого разрешения (ОЛР кривые) в течение секундного освещения светом 3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и определение величины $1-S_M$ [38,39]; 3) регистрация индукции флуоресценции хлорофилла *a* при низкой (8 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$) интенсивности света с помощью ПАМ-флуориметрии и определение параметра «*p*» – углового коэффициента касательной медленной фазы индукционной кривой [16]. В присутствии системы КС/КСО во всех случаях детектировали уменьшение уровня восстановления пула ПХ: наблюдали более низкие величины $1-qP$ и $1-qL$ на 8–10% и 13–17% при 100 и 200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ соответственно [15]; уменьшение величины $1-S_M$, характеризующей уровень восстановления пула, практически в 2 раза при подаче второй вспышки, при которой больше молекул пластохинона находилось в восстановленном состоянии [16]; снижение параметра «*p*» на 50–80% в зависимости от эксперимента, что свидетельствует о замедлении восстановления пула ПХ в условиях повышенной генерации $\text{O}_2^{\bullet-}$ при низкой интенсивности света [16]. Таким образом, полученные во всех трех случаях данные показывают, что в присутствии системы КС/КСО наблюдается снижение относительного уровня восстановления пула ПХ, что свидетельствует об окислении молекул ПХН_2 при подаче $\text{O}_2^{\bullet-}$ к мембране, подтверждая возможность протекания реакции ПХН_2 с $\text{O}_2^{\bullet-}$ в тилакоидах. Важно отметить, что схожие данные получали и в отсутствие, и в присутствии динитрофенилового эфира 2-йодо-4-нитротимола, ингибитора окисления ПХН_2 в хинол-окисляющем сайте цитохромного b_6/f комплекса, что исключает возможную роль фотосистемы I в изучаемых процессах.

Реакция (1) является термодинамически выгодной в водных растворах; рассчитанная на основе значений E_{m7} окислительно-восстановительных пар, участвующих в реакции – $\text{ПХ}^{\bullet-}/\text{ПХН}_2$ (370 мВ) и $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2$ (940 мВ) – константа равновесия составляет $\sim 10^9$ [1]. В исследовании [40] было обнаружено, что ПХН_2 даже более эффективен в нейтрализации $\text{O}_2^{\bullet-}$, чем восстановленный R-токоферолхинон и R-токоферол. Учитывая расположение ПХН_2 в тилакоидной мембране (см. выше), реакция (1) должна протекать на границе фаз мембрана/вода (стро-

ма), где константа скорости реакции составляет $\sim 10^7 \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$ (см. выше). В органических растворителях реакция протекает медленнее: в метаноле скорость реакции соответствует $1.1 \cdot 10^4 \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [41]. Реакция ПХН_2 с протонированным $\text{O}_2^{\bullet-}$, пергидроксильным радикалом HO_2^{\bullet} ($\text{O}_2^{\bullet-}$ может превратиться в HO_2^{\bullet} в гидрофобной среде) также может протекать в биологических объектах, однако она протекает медленнее, константа скорости реакции в органических растворителях соответствует $\sim 10^3 \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [42]. При переходе из гидрофобной фазы мембраны в обогащенные водой участки на границе мембраны HO_2^{\bullet} теряет протон (рК HO_2^{\bullet} ($\text{O}_2^{\bullet-}$) 4.8).

В работе [1] высказано предположение, что не только молекулы ПХН_2 (реакция (1)), но и молекулы ПХ могут взаимодействовать с $\text{O}_2^{\bullet-}$ (реакция (2)). Однако если реакция (1) протекает в обогащенных водой участках на границе фаз мембрана/вода, то реакция (2) термодинамически может протекать в гидрофобных зонах мембраны (вероятнее всего с незначительными скоростями), где окислительно-восстановительные потенциалы веществ данной реакции существенно ниже: окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ равен ~ -550 мВ в гидрофобной фазе (по сравнению с -160 мВ при 1 М O_2 в H_2O); при этом окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{ПХ}/\text{ПХ}^{\bullet-}$ также должен быть ниже (по сравнению с -170 мВ в H_2O) [43]. Однако все еще отсутствуют прямые доказательства возможности протекания данной реакции в тилакоидной мембране. Равновесие данной реакции будет смещаться в сторону восстановления молекулярного кислорода до $\text{O}_2^{\bullet-}$, если данная реакция будет протекать в водной фазе.

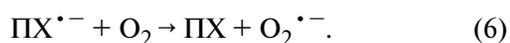
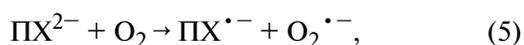
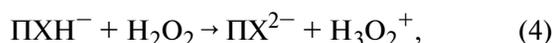


Известно, что при восстановлении молекулярного кислорода системой КС/КСО не все $\text{O}_2^{\bullet-}$ оказываются в среде, часть $\text{O}_2^{\bullet-}$ очень быстро «довосстанавливается» до H_2O_2 непосредственно в активном центре фермента, а появившиеся в среде $\text{O}_2^{\bullet-}$ если не провзаимодействуют с ПХН_2 , то в дальнейшем дисмутируют также с образованием H_2O_2 . Эксперименты с добавлением каталазы – фермента, разлагающего H_2O_2 , – показали, что не все окисление пула ПХ в присутствии системы КС/КСО является следствием взаимодействия ПХН_2 с $\text{O}_2^{\bullet-}$, но и (до 40%) следствием окисления ПХН_2 молекулами H_2O_2 [16]. Полу-

ченные результаты оказались неожиданными, учитывая отсутствие в литературе прямых данных о взаимодействии компонентов пула ПХ с H_2O_2 в тилакоидах.

Ранее было показано, что галогенированные хиноны или хиноны с окислительно-восстановительным потенциалом от -330 до -460 мВ могут выступать восстановителями H_2O_2 до гидроксильного радикала (HO^\bullet) [44–46]. Впоследствии авторы работы [47] представили данные о способности негалогенированных хинонов, таких как 1,4-нафтохинон, тетраметил-1,4-бензохинон, 2-метил-1,4-нафтохинон, 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон, 2,6-диметилбензохинон, 2,6-диметоксибензохинон и 9,10-фенантрахинон, увеличивать скорость восстановления H_2O_2 в присутствии аскорбата. В этом случае, как предположено авторами, окисление хинонов происходит через реакцию H_2O_2 с однократно восстановленным хиноном, семихиноном, который образуется вследствие реакции конпропорционирования ПХ и ПХН_2 ; константа скорости реакции конпропорционирования соответствует $\sim 5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [43].

В дальнейшем в работе [19] авторами была продемонстрирована возможность взаимодействия ПХН_2 и H_2O_2 в модельной системе, в метаноле, однако представленные данные указывали на низкую скорость протекания данной реакции, поскольку добавление H_2O_2 даже в высокой концентрации (до 5 мМ) приводило к окислению менее 50% всех молекул ПХН_2 , при этом изначальная концентрация ПХН_2 была существенно ниже (100 мкМ), чем концентрация H_2O_2 . Был предложен двухэтапный механизм взаимодействия ПХН_2 и H_2O_2 , согласно которому это взаимодействие происходит по механизму депротонирования ПХН_2 (реакции (3) и (4)) с последующим автотокаталитическим окислением ПХН^- и ПХ^{2-} молекулярным кислородом до ПХ (реакции (5) и (6)) [19]:



Для исследования влияния H_2O_2 на уровень восстановления пула ПХ в тилакоидах проводили измерение ОЛР-кривых: при добавлении H_2O_2 (100 мкМ) к суспензии тилакоидов наблюдали окисление пула ПХ (диссертационная работа М.М. Борисовой, <https://istina.msu.ru/dissertations/359506151/>). В работе [48] авторы более по-

дробно изучили влияние H_2O_2 на окислительно-восстановительное состояние пула ПХ: после предварительного освещения суспензии тилакоидов, в результате которого происходило накопление H_2O_2 , наблюдалось более быстрое окисление пула ПХ в темноте после выключения света.

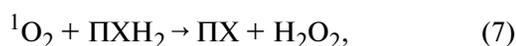
Таким образом, на основе представленных данных можно заключить, что восстановленный пластохинон ПХН_2 с высокой скоростью взаимодействует с $\text{O}_2^{\bullet-}$ в тилакоидах, восстанавливая его до H_2O_2 . Молекулы H_2O_2 , в свою очередь, также способны окислить ПХН_2 , однако с более низкими скоростями. Первая реакция характеризует антиоксидантную активность ПХН_2 в ФЭТЦ хлоропластов высших растений, вторая реакция приводит к снижению содержания H_2O_2 в хлоропластах, но не является проявлением антиоксидантной активности как таковой, поскольку приводит, согласно представленным литературным данным, к образованию либо $\text{O}_2^{\bullet-}$, либо OH^\bullet – более реакционноспособных АФК, чем H_2O_2 .

Известно, что стрессовые условия приводят не только к увеличению скорости восстановления молекулярного кислорода до $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в тилакоидах, но и к повышению скорости генерации синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, преимущественно в фотосистеме II, путем передачи энергии от хлорофилла в триплетном состоянии, при условии его генерации, на молекулярный кислород [49, 50]. В литературе представлены два возможных механизма образования возбужденного хлорофилла в триплетном состоянии в фотосистеме II: 1) в антенне фотосистемы II электрон в молекуле хлорофилла, находящейся в возбужденном синглетном состоянии, может поменять спин, приводя к переходу молекулы хлорофилла в более низкоэнергетическое триплетное состояние и 2) триплетное состояние возбужденного хлорофилла может образоваться в реакционном центре фотосистемы II в результате рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $\text{P680}^+ - \text{феофетин}^-$ [51].

Пластохинон в восстановленной форме может напрямую взаимодействовать с $^1\text{O}_2$ [17, 19, 52], выполняя роль физического или химического тушителя $^1\text{O}_2$ [18]. Константа скорости реакции ПХН_2 с $^1\text{O}_2$, измеренная в ацетонитриле, равна $\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [12, 18]. Физический механизм тушения $^1\text{O}_2$ молекулами ПХН_2 основан на передаче энергии от $^1\text{O}_2$ к ПХН_2 , что приводит к обратному переходу синглетного состояния молекулярного кислорода в триплетное. Химический механизм

тушения связан с окислением ПХН₂ (предположительно боковой изопреноидной цепи), что приводит к образованию гидроксиластохинона, т.е. пластохинона С [18] (рис. 1б). В зависимости от количества актов взаимодействия ПХН₂ с ¹O₂ пластохинон С может иметь несколько гидроксильных групп в составе боковой изопреноидной цепи. Кроме того, дальнейшее окисление пластохинона С может привести к образованию других производных, а именно сложных эфиров пластохинона и жирных кислот, т.е. пластохинона В (рис. 1в).

В работе [19] был предложен альтернативный химический механизм взаимодействия ¹O₂ с ПХН₂, согласно которому ПХН₂ окисляется до ПХ с образованием Н₂O₂ (реакция (7)):



В литературе обсуждается антиоксидантная активность именно восстановленного пластохинона, т.е. ПХН₂, в отношении синглетного кислорода. Однако по первому химическому механизму не только ПХН₂, но и окисленный пластохинон способен тушить ¹O₂ ([18], наши неопубликованные данные). Таким образом, как реакцию ПХН₂ с ¹O₂, так и реакцию ПХ с ¹O₂ можно представить как еще один важный аспект антиоксидантной активности пула пластохинона.

ВЛИЯНИЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ, А ТАКЖЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПЛАСТОХИНОНА В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

Пластохинон в растительной клетке представлен фотоактивным и нефотоактивным пулами. Фотоактивный пул ПХ расположен в тилакоидных мембранах, где пластохинон функционирует в качестве мобильного липофильного переносчика электронов в ФЭТЦ между фотосистемой II и цитохромным *b₆/f* комплексом. Помимо линейного транспорта электронов фотоактивный пул ПХ вовлечен в циклический электронный транспорт вокруг фотосистемы I [53] и восстановление молекулярного кислорода до Н₂O₂, т.е. в реакцию Мелера (см. выше; для обзора см. работу [54]). Нефотоактивный пул ПХ запасается в пластоглобулах и оболочке хлоропластов и не принимает участие в фотосинтезе.

По мере роста и развития растений в растительных клетках происходит увеличение содержания пластохинона. Например, на ранних этапах развития листьев ячменя (*Hordeum vulgare L.*), а именно от 4-х к 11-м суткам, общее содержание

пластохинона, рассчитанное на 1000 молекул хлорофилла, увеличивается на 55% [55]. Несмотря на то, что размер фотоактивного пула ПХ не изменялся в исследуемый период роста, было отмечено, что 11-суточные проростки характеризовались более окисленным фотоактивным пулом ПХ [55]. Так, отношение окисленного пластохинона фотоактивного пула к общему фотоактивному пулу у четырехсуточных проростков составило $36.4 \pm 12.5\%$ по сравнению с $56.0 \pm 3.9\%$ у 11-суточных. Содержание окисленного и восстановленного пластохинона оценивали методом ВЭЖХ с использованием спектрофотометрического детектора (для окисленного ПХ) и флуоресцентного детектора (для восстановленного ПХ) [55].

При исследовании изменения содержания пластохинона в растениях *A. thaliana* в ходе более продолжительного роста и развития (от 20 суток до 3 месяцев) было показано, что общее содержание пластохинона, отнесенное к содержанию хлорофилла, также постепенно возрастает. На фоне этого увеличения изменялось количество окислительного и восстановленного пластохинона. Так, у двухмесячных растений, выращенных при низкой интенсивности света, до 70% от общего содержания пластохинона в листьях находилось в восстановленном состоянии, а у трехмесячных – до 100% [22]. При высокой интенсивности света содержание ПХН₂ у взрослых листьев также было выше, чем у молодых; можно предположить, что у более взрослых листьев и фотоактивный пул ПХ был более восстановлен. Также ярким примером накопления пластохинона по мере взросления являются фиговые деревья (*Ficus elastica Roxb.*), во взрослых листьях которых содержится примерно в 20 раз больше пластохинона на единицу площади листа, чем в молодых листьях (см. обзор [24]).

Содержание пластохинона изменяется не только в онтогенезе, но и отличается в разных видах растений [56]. Например, в магелланской фуксии (*Fuchsia magellanica*) общее содержание пластохинона достигает 774.3 мкг на 1 г сухого веса. Для сравнения: папоротник *Blechnum chilense* содержит всего 83 мкг на 1 г сухого веса, а мох *Hypopterygium arbuscula* – 23 мкг [56].

Абиотические стрессовые факторы также могут существенным образом влиять на биосинтез пластохинона в клетке и окислительно-восстановительное состояние пула ПХ. Наиболее изученным является влияние повышенной освещенности на содержание пластохинона в растительных клетках. Многократно показано, что увеличение уровня освещенности растений приводит к накоплению пластохинона [22, 24, 25, 57]. Например, содержание пластохинона на единицу сухого веса листа было в 3 раза выше в растениях,

выращенных при интенсивности света $750 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ по сравнению с растениями, выращенными при $65 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [25]. Интересно, что это не влияло на количество пластохинона в фотоактивном пуле: накопление пластохинона при повышенной освещенности происходило в нефотоактивном пуле, т.е. в пластоглобулах и оболочке хлоропластов [25].

Изменение температуры, как и изменение уровня освещенности, влияет на содержание пластохинона. Было показано, что листья томатов (*S. lycopersicum* L.) 5-6-недельного возраста, подверженные в течение 6 суток действию высокой температуры (38°C), содержали значительно больше пластохинона (примерно в 3 раза больше на единицу сырого веса), чем растения, растущие при температуре 20°C (контроль) [58]. Интересно, что возвращение растений после нагревания в контрольные условия не приводило к снижению содержания пластохинона даже через 5 суток [58]. Повышение температуры влияет и на перераспределение пластохинона между фотоактивным и нефотоактивным пулами в растительных клетках [55]. 4-, 7- и 11-суточные проростки ячменя подвергали тепловому стрессу (3 часа при 40°C) при непрерывном освещении ($100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$); после термической обработки не было выявлено изменений ни в общем содержании пластохинона, ни в окислительно-восстановительном состоянии пула ПХ [55]. Отсутствие изменений может быть связано с недостаточностью экспозиции. Однако наблюдали термоиндуцированные изменения в соотношении между фотоактивным и нефотоактивным пулами. Так, было зафиксировано общее снижение содержания пластохинона в фотоактивном пуле, причем данный эффект был наиболее сильно выражен у более взрослых растений: фотоактивный пул ПХ у 11-суточных проростков уменьшался более, чем на 50%, при этом количество пластохинона в нефотоактивном пуле увеличилось [55].

Действие низких температур также влияет на содержание пластохинона в клетках. Растения озимой ржи (*Secale cereale* L.), выращенные при интенсивности света $250 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температуре 5°C до состояния полностью раскрывшихся вторых и третьих листьев, содержали на 15% больше пластохинона, в расчете на хлорофилл, чем растения, выращенные при 20°C и такой же интенсивности света [57]. Ранее было показано, что у другого сорта озимой ржи (*Secale cereale* L. cv *Puma*), которая росла при температуре 5°C в течение 10 недель, общее содержание пластохинона в расчете на хлорофилл возрастало на 260% [59].

При исследовании влияния засоления на гликофиты и галофиты, представителями которых являются *A. thaliana* и *E. salsugineum* соответственно, было показано, что засоление почвы (0.15 M NaCl , 7 суток) не приводило к изменению содержания пластохинона у *A. thaliana*, однако пул ПХ становился менее восстановленным ~ на 10%. У *E. salsugineum* засоление (0.3 M NaCl , 7 суток) не повлияло ни на окислительно-восстановительное состояние пула, ни на общее количество пластохинона [60], что, по-видимому, отражает отсутствие развития стресса в галофитных растениях в изучаемых условиях. При этом в контрольных условиях у обоих видов уровень окислительно-восстановительного состояния пула ПХ практически не отличался [60].

В работе [61] было проведено исследование влияния полива растений раствором NaCl в более высокой концентрации (0.4 M), на содержание пластохинона у галофитных растений *Mesembryanthemum crystallinum*. На 10-е сутки эксперимента общее содержание пластохинона по отношению к содержанию хлорофилла в контрольных растениях и в растениях, обработанных NaCl , не отличалось ($51.6 \text{ моль}/1000 \text{ моль}$ и $46.6 \text{ моль}/1000 \text{ моль}$ соответственно). Однако соотношение фотоактивного и нефотоактивного пулов значимо различалось: в отличие от действия повышенной температуры, засоление приводило к увеличению содержания пластохинона в фотоактивном пуле у галофитных растений (*Mesembryanthemum crystallinum*) [61]. В контрольных растениях доля фотоактивного пула составила ~17% от общего содержания пластохинона, в то время как у растений в условиях засоления доля фотоактивного пула составила ~30% [61].

Показано, что не только абиотические, но и биотические факторы, например, заражение фитопатогенами, влияют на содержание пластохинона в листьях. Обработка листьев *S. nigrum* раствором элиситора (*P. infestans*) приводила к увеличению содержания пластохинона на единицу сырого веса листа как на свету (на 34% по сравнению с контрольными растениями), так и в темноте (на 96%) [21]. Более значительное увеличение содержания пластохинона в темноте, вероятно, более полно отражает патоген-зависимое изменение содержания, так как на свету изменение содержания пластохинона регулируется еще и протеканием светозависимых реакций. Можно предположить, что увеличение содержания пластохинона в листьях при атаке патогенами необходимо для осуществления антиоксидантной функции пластохинона, т.е. для защиты клеток от АФК, образующихся в этих условиях. Кроме того, изменение окислительно-восстановительного

состояния фотоактивного пула ПХ, в частности, повышение уровня восстановления, отражает изменения в условиях окружающей среды, запуская ряд адаптационных механизмов, от которых зависит функциональное состояние растений, начиная от изменения фотосинтетических характеристик, синтеза сигнальных агентов клеток, экспрессии генов, — до изменений в микробном составе почвы посредством влияния на гормональный статус растений. Например, было показано, что растения *M. crystallinum L.* не способны развивать защитный ответ на атаку фитопатогенами (*B. cinerea*) при искусственном поддержании пула ПХ в окисленном состоянии путем использования диурина — ингибитора электронного транспорта от фотосистемы II к пулу ПХ [62]. В этой работе было обнаружено, что одним из защитных ответов при заражении фитопатогенами является возрастание активности каталазы и супероксиддисмутазы в листьях; однако такая реакция не развивалась в листьях растений, обработанных диурином (500 мкМ), но развивалась в листьях растений, обработанных дибромтимохином (500 мкМ) — ингибитором окисления ПХН₂ в цитохромном *b₆/f*-комплексе [62]. Нельзя исключить, что наблюдаемый эффект в присутствии дибромтимохинона связан с более высокой скоростью образования пероксида водорода компонентами пула ПХ, чем в присутствии диурина. Ранее было показано, что пероксид водорода является одной из важнейших сигнальных молекул, участвующих в регуляции метаболизма растений в стрессовых условиях [63–66].

Таким образом, разные стрессовые факторы оказывают разное влияние на общее содержание пластохинона и его перераспределение между фотоактивным и нефотоактивным пулами. В настоящее время активно изучаются механизмы обмена метаболитами между пластоглобулами и тилакоидными мембранами [67–69], в частности, было высказано предположение, что пластоглобулярная киназа ABC1K1 способствует диффузии молекул пластохинона из пластоглобул в тилакоидные мембраны для обновления молекул пластохинона в пуле ПХ [69]. Было показано, что растения, нокаутированные по гену *abc1k1*, характеризуются более низким содержанием пластохинона в фотоактивном пуле, но более высоким в нефотоактивном. Однако детальный молекулярный механизм поддержания уровня фотоактивного пула ПХ, необходимого для оптимальных скоростей фотосинтеза, все еще остается невыясненным.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что увеличение содержания пластохинона и/или изменение количества окисленных и восстановленных форм пластохинона в растительных клетках происходит по мере роста и

развития растений, а также в ответ на действие различных абиотических (например, повышенная освещенность, низкие и высокие температуры) и биотических (например, заражение патогенами) стрессовых факторов (табл. 1). Возрастные содержания пластохинона может быть связано с необходимостью поддержания высокой скорости обновления пластохинона в тилакоидных мембранах и для поддержания, таким образом, эффективного электронного транспорта в ФЭТЦ, особенно в условиях стресса, а также с выполнением антиоксидантной функции пластохиноном. При этом изменение окислительно-восстановительного состояния пула ПХ, преимущественно увеличение уровня восстановления пула, которое происходит при действии стрессовых факторов, важно для инициации различных адаптационных ответов.

ПОДХОДЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПЛАСТОХИНОНА В РАСТЕНИЯХ И СПОСОБЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЛАСТОХИНОНА В БИОМЕДИЦИНЕ

Увеличение количества антиоксидантов, особенно расположенных в липидной фазе, является перспективным подходом для получения растений, обладающих повышенной устойчивостью к стрессовым факторам (см. Введение). Учитывая, что увеличение скорости образования АФК в ФЭТЦ происходит в ответ на действие различных абиотических и биотических стрессовых факторов и что пластохинон является эффективным мембранным антиоксидантом, увеличение содержания пластохинона может стать универсальным подходом для создания растений с повышенной устойчивостью к разным факторам окружающей среды.

Пластохинон является неферментативным антиоксидантом, что усложняет получение растений с его повышенным содержанием. Биосинтез пластохинона включает образование предшественников боковой цепи и бензохинонового кольца в цитоплазме, изопентинилдифосфата и L-тирозина, соответственно, которые транспортируются из цитоплазмы в хлоропласт. В хлоропласте из изопентинилдифосфата с участием фермента соланезилдифосфатсинтазы (SPS) синтезируется соланезилдифосфат, а из L-тирозина в конечном счете — гомогентизат. Под действием фермента гомогентизатсоланезилдифосфаттрансферазы происходит конденсация боковой цепи и бензохинонового кольца из соланезилдифосфата и гомогентизата с образованием метилсоланезилбензохинона и в дальнейшем пластохинона с участием фермента 2-метил-6-фитилбензохинолметилтрансферазы (рис. 2).

В литературе представлены два основных подхода, позволяющие увеличить содержание не-

Таблица 1. Влияние стрессовых факторов на содержание пластохинона в листьях растений

Воздействие	Вид растения	Общее содержание ПХ, % от контроля	Доля фотоактивного пула ПХ	Доля восстановленного ПХ
Высокая интенсивность света	<i>A. thaliana</i> [25]	Увеличивается, 300%	Не изменяется	Нет данных
	<i>A. thaliana</i> [22]	Увеличивается, 800–1100%	Уменьшается	Увеличивается
	<i>Fagus sylvatica</i> L. [24]	Увеличивается, 500%	Нет данных	Нет данных
	<i>Secale cereale</i> L. [57]	Увеличивается, 200%	Нет данных	Нет данных
Высокая температура	<i>S. lycopersicum</i> [58]	Увеличивается, 300%	Нет данных	Увеличивается
	<i>H. vulgare</i> [55]	Не изменяется	Уменьшается	Не изменяется
Низкая температура	<i>S. cereale</i> [55]	Увеличивается, 115%	Нет данных	Нет данных
	<i>Secale cereale</i> L. cv <i>Puma</i> [59]	Увеличивается, 260%	Нет данных	Нет данных
Засоление	<i>A. thaliana</i> [60]	Не изменяется	Нет данных	Уменьшается
	<i>E. salsugineum</i> [60]	Не изменяется	Нет данных	Не изменяется
	<i>M. crystallinum</i> [61]	Не изменяется	Увеличивается	Нет данных
Фитопатогены	<i>S. nigrum</i> [21]	Увеличивается, 134 – 196%	Нет данных	Нет данных

ферментативных антиоксидантов: 1) увеличение экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе данных антиоксидантов, и 2) ингибирование/снижение активности ферментов, использующих целевой антиоксидант для синтеза других метаболитов. Например, из синтезированного пластохинона под действием фермента токоферолциклазы (VTE1, рис. 2) происходит образование пластохромола-8, который также является антиоксидантом неферментативной природы. Более того, VTE1 участвует в биосинтезе и других эффективных антиоксидантов – токоферолов (не представлено на рис. 2). Было показано, что в растениях, дефицитных по VTE1, не только заблокирован синтез токоферола и пластохромола, но и снижено содержание пластохинона, оно составляет примерно 25% от общего содержания пластохинона в растениях дикого типа [27]. Таким образом, для получения растений с повышенным содержанием пластохинона более перспективным является подход с увеличением экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза пластохинона.

На рис. 2 представлена схема биосинтеза пластохинона в хлоропластах, одним из ключевых ферментов биосинтеза пластохинона является соланезилдифосфатсинтаза, катализирующая конденсацию боковой цепи пластохинона. В геноме арабидопсиса содержатся три гена *AtSPS1* (*At1g78510*), *AtSPS2* (*At1g17050*) и *AtSPS3* (*At2g34630*), кодирующие три соланезилдифосфатсинтазы, две из которых участвуют в биосинтезе пластохинона, а третья – *AtSPS3* – участвует в биосинтезе убихинона в митохондриях [70, 71]. Подобные ферменты были обнаружены во всех наземных растениях. Интересно, что у цианобактерий есть только один ген, кодирующий этот класс ферментов, тогда как у всех без исключения растений их несколько. Например, у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, красной водоросли *Cyanidioschyzon merolae*, ячменя, винограда, томата и огурца их два, у мха *Physcomitrella patens*, кукурузы, риса и сои – три, как у арабидопсиса, а у травянистого вида *Brachypodium distachyon* – четыре [71].

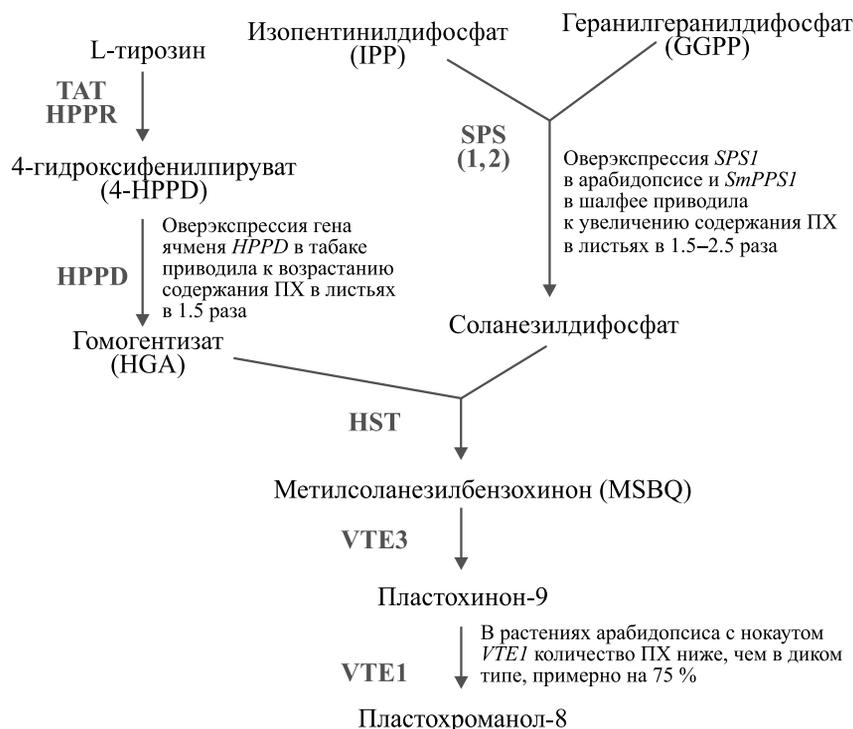


Рис. 2. Схема биосинтеза пластохинона в хлоропластах. Обозначения: TAT – тирозинаминотрансфераза, HPPR – 4-гидроксифенилпируватредуктаза, HPPD – 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа, SPS(1,2) – соланезилдифосфатсинтаза 1 и 2, HST – гомогентизатсоланезилдифосфаттрансфераза, VTE3 – 2-метил-6-фитилбензохиномметилтрансфераза, VTE1 – токоферолциклаза. Зеленым цветом обозначены названия ферментов, черным цветом – названия метаболитов.

Показано, что фермент SPS2, продукт гена *AtSPS2* (*At1g17050*), локализован в хлоропластах [71,72]. В то же время в литературе содержится противоречивая информация о локализации SPS1, продукта гена *AtSPS1* (*At1g78510*), в клетках арабидопсиса: было показано, что данный фермент располагается в эндоплазматическом ретикулуме [72], однако позже было показано, что фермент SPS1 обнаруживается исключительно в хлоропластах [71].

Гиперэкспрессия под конститутивным 35S промотором гена *AtSPS1* в листьях арабидопсиса приводила к достоверному увеличению содержания пластохинона (в 1.5 раза) [27]. Повышенная экспрессия оказывала влияние только на количество пластохинона в нефотоактивном пуле [27]; при этом растения с гиперэкспрессией *AtSPS1* оказывались более устойчивы к действию повышенной освещенности (1300 мкмоль квантов $m^{-2}c^{-1}$) по сравнению с растениями дикого типа. Растения с повышенным содержанием пластохинона накапливали меньше продуктов перекисного окисления липидов; фотосистема II таких растений оказывалась менее подвержена фотоингибированию [27]. Интересно, что в растениях с повышенной экспрессией *AtSPS1* происходило более выраженное увеличение накопления пла-

стохроманола (примерно в 3 раза); можно предположить, что повышенная устойчивость растений связана с увеличением количества не только пластохинона, но и пластохроманола. Однако значительное увеличение количества пластохроманола в растениях с повышенной экспрессией VTE1 не приводило к увеличению устойчивости этих растений к повышенной освещенности [27]. Гиперэкспрессия гена *SmPPS1*, кодирующего соланезилдифосфатсинтазу в шалфее краснокорневищном (*Salvia miltiorrhiza*), приводила к возрастанию содержания пластохинона примерно в 2.5 раза по сравнению с растениями дикого типа [73].

В растениях арабидопсиса с нокаутом *AtSPS1* содержание пластохинона на 11% ниже, чем в растениях дикого типа, в то время как нокаут *AtSPS2* приводит к более значительному снижению содержания ПХ – до 57% [71]. Содержание пластохроманола снижалось на 35% в растениях без SPS1, в то время как в растениях, нокаутированных по гену *SPS2*, пластохроманол не детектировался вовсе. Более того, количество пластохинона в фотоактивном пуле в растениях без SPS2 значительно снижалось (примерно на 60%), а в растениях без SPS1 размер фотоактивного пула не изменялся [71], как и в растениях с гиперэк-

прессией SPS1 [27]. Размер нефотоактивного пула снижался у растений без SPS1, но более выраженное снижение (на 40%) также происходило у растений без SPS2. Можно предположить, что роль SPS2 в биосинтезе пластохинона может быть более значимой, чем роль SPS1, что делает растения с гиперэкспрессией *AtSPS2* более перспективными с точки зрения повышения содержания пластохинона и устойчивости к действию различных стрессовых факторов. Гиперэкспрессия гена ячменя *HPPD*, 4-гидрофенилпируватдиоксигеназы, фермента, участвующего в биосинтезе и токоферола, и пластохинона (рис. 2), в растениях табака приводила к возрастанию содержания пластохинона в листьях, примерно в 1.5 раза по сравнению с растениями дикого типа [26]. Увеличение содержания токоферолов в листьях полученных растений табака не наблюдалось [26]. Растения сладкого картофеля с повышенной экспрессией *HPPD* оказывались более устойчивы к действию засухи (прекращение полива на 14 дней), засоления (полив 200 мМ NaCl) и окислительного стресса, вызванного инкубацией высевок листа в растворе метилвиологена (50 мкМ) [74]. При этом авторы этой работы, как и авторы работы [26], не наблюдали увеличения содержания токоферолов в листьях сладкого картофеля. К сожалению, авторы не определяли содержание пластохинона, поэтому причина повышенной устойчивости к абиотическим стрессовым факторам растений с повышенной экспрессией *HPPD* остается невыясненным, но можно предположить основную роль именно пластохинона в этой устойчивости.

Потенциально перспективным для получения растений с повышенным содержанием пластохинона может стать увеличение экспрессии гена, кодирующего белок фибриллин 5 (FBN5). Было показано, что этот белок участвует в биосинтезе пластохинона в арабидопсисе [75] и рисе [76]. FBN5 взаимодействует с SPS1 и SPS2 в хлоропластах. Была выдвинута гипотеза, что FBN5 стимулирует ферментативную активность SPS1 и SPS2, связываясь с гидрофобным «соланезильным» мотивом и способствуя высвобождению этого мотива из SPS1 и SPS2 в арабидопсисе [75]. Общее содержание пластохинона значительно снижалось в мутантных растениях арабидопсиса и риса с заблокированным синтезом FBN5. Более того, такие растения оказывались более восприимчивы к холодовому стрессу и повышенной освещенности по сравнению с растениями дикого типа [75,76].

Учитывая высокую антиоксидантную активность пластохинона в растениях, представляется перспективным применение природного пластохинона в практических целях. Благодаря липофильной природе, пластохинон может быть использован в качестве протектора мембранных

структур при окислительном стрессе. На данный момент в литературе не удалось найти информации о применении пластохинона-9, изолированного из растительных клеток, что, вероятнее всего, связано со сложностью выделения и очистки в количествах, достаточных для проведения тестирований. Аналог пластохинона, 9'-гидроксисаргахинон (9'-hydroxysargaquinone, 9'-HSQ) с боковой цепью из 16 молекул углерода, выделенный из антарктической бурой водоросли *Desmarestia menziesii*, как было показано, проявляет высокую цитотоксичность против лимфоидных новообразований [77]. Показано, что другой аналог пластохинона – 2-геранилгеранил-6-метилбензохинон (15 молекул углерода в боковой цепи), изолированный из бурой водоросли *Sargassum micracanthum*, обладает высокой антиоксидантной активностью, а также противовирусной активностью в отношении цитомегаловируса человека [78, 79].

В настоящее время активно исследуются митохондриально-направленные антиоксиданты, разработанные под руководством академика В.П. Скулачева, так называемые «ионы Скулачева», в том числе содержащие в качестве антиоксиданта синтетический аналог пластохинона – децилпластохинон (SkQ, 10 углеродов в боковой цепи). Для направления антиоксиданта в митохондрии используется трифенилфосфониевый катион. Целый ряд работ посвящен исследованию нейропротекторного действия SkQ при различных патологиях (например, ишемия мозга, болезнь Альцгеймера, возрастные нейродегенеративные изменения) [80–82]. В настоящее время несколько препаратов с активным веществом SkQ1 проходят клинические испытания, в частности препарат для лечения рассеянного склероза.

В других представленных в литературе исследованиях в качестве синтетических аналогов пластохинона рассматриваются различные 1,4-бензохиноны, в которых изопреноидный хвост отсутствует или может быть заменен другими группами. Показано, что синтетические аналоги пластохинона различной структуры, как галогенированные, так и негалогенированные, обладают цитотоксичностью против разных видов рака [83,84], антимикробной [85,86] и антигрибковой активностями [87]. Аминобензохиноны, представляющие собой ряд гетероциклических аминов, связанных с ядром 1,4-бензохинонов, также обладают антибактериальной и противогрибковой активностью [88]. Кроме того, показано, что некоторые аминобензохиноны обладают значительной антипролиферативной активностью в отношении раковых клеток [89]. Кроме описанных выше работ существует ряд патентов на применение аналогов пластохинона: например, применение 1,4-бензохинонов с двумя полипрениловыми цепями, содержащими 2 или 3 изопреновых

фрагмента, в противораковой терапии (RU 2411229 С2).

Аналог пластохинона – убихинон, липофильный переносчик дыхательной цепи митохондрий, также активно исследуется в качестве терапевтического агента при целом ряде заболеваний, таких как сердечная недостаточность [90], болезнь Паркинсона и хорея Хантингтона [91, 92], рак [93, 94]. Проводятся исследования на модельных животных и человеке применения убихинона для лечения ожогов ([95, 96], для обзора см. [97, 98]). На данный момент разработаны и активно используются в косметической промышленности крема и другие средства, содержащие в качестве антиоксиданта убихинон.

Все исследуемые аналоги пластохинона обладают более короткими, чем пластохинон-9, боковыми изопреноидными цепями. Основные протекторные свойства хинонов связывают именно с бензохиноновым кольцом, однако длина изопреноидной цепи связана со стабильностью молекулы в гидрофобном липидном бислое. Более того, эта характеристика пластохинона, по-видимому, влияет на другие свойства, такие как подвижность и межмолекулярное взаимодействие с мембранными белками. Механизм протекторного действия пластохинона также может заключаться в стабилизации клеточных мембран: пластохинон, обладая длинной изопреноидной боковой цепью, при встраивании в цитоплазматическую мембрану может увеличивать стабильность мембран, что особенно важно в стрессовых условиях. Кроме того, как показано выше, и антиоксидантная активность пластохинона связана не только с кольцом, но и с боковой цепью, например, тушение синглетного кислорода пластохиноном по химическому механизму с образованием гидроксипроизводных пластохинона. Таким образом, применение изолированного и очищенного пластохинона-9 является актуальным направлением не только благодаря высокой активности пластохинона как антиоксиданта в защите плазматических мембран от окислительного стресса, но и благодаря возможному проявлению свойств, отличных от свойств аналогов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Б.Н. Иванову и Д.В. Вильянен (ИФПБ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН) за помощь в обсуждении данных обзора.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00396, <https://rscf.ru/project/23-14-00396>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mubarakshina M. M. and Ivanov B. N. The Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in the Plastocyanin Pool of Chloroplast Thylakoid Membranes. *Physiol. Plantarum*, **140**, 103–110 (2010). DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01391.x
2. Kozuleva M. A., Ivanov B. N., Vetoshkina D. V., and Borisova-Mubarakshina M. M. Minimizing an Electron Flow to Molecular Oxygen in Photosynthetic Electron Transfer Chain: An Evolutionary View. *Front. Plant Sci.*, **11** (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00211
3. Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L., and Foyer C. H. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: A Predominant Role for Photorespiration? *Ann. Bot.*, **89** (Spec No), 841–850 (2002). DOI: 10.1093/aob/mcf096
4. Noctor G., Mhamdi A., and Foyer C. H. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not so Cut and Dried. *Plant Physiol.*, **164**, 1636–1648 (2014). DOI: 10.1104/pp.113.233478
5. Steinhilber L. and Kudla J. Calcium and Reactive Oxygen Species Rule the Waves of Signaling. *Plant Physiol.*, **163**, 471–485 (2013). DOI: 10.1104/pp.113.222950
6. Kwak J. M., Mori I. C., Pei Z.-M., Leonhardt N., Torres M. A., Dangl J. L., Bloom R. E., Bodde S., Jones J. D. G., and Schroeder J. I. NADPH Oxidase AtrbohD and AtrbohF Genes Function in ROS-Dependent ABA Signaling in Arabidopsis. *EMBO J.*, **22**, 2623–2633 (2003). DOI: 10.1093/emboj/cdg277
7. Rudenko N. N., Vetoshkina D. V., Marenkova T. V., and Borisova-Mubarakshina M. M. Antioxidants of Non-Enzymatic Nature: Their Function in Higher Plant Cells and the Ways of Boosting Their Biosynthesis. *Antioxidants*, **12**, 2014 (2023). DOI: 10.3390/antiox12112014
8. Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., and Ivanov B. Production of Superoxide in Chloroplast Thylakoid Membranes: ESR Study with Cyclic Hydroxylamines of Different Lipophilicity. *FEBS Lett.*, **585**, 1067–1071 (2011). DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.004
9. Borisova M. M., Kozuleva M. A., Rudenko N. N., Naydov I. A., Klenina I. B., and Ivanov B. N. Photosynthetic Electron Flow to Oxygen and Diffusion of Hydrogen Peroxide through the Chloroplast Envelope via Aquaporins. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*,

- 1817, 1314–1321 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.036
10. Mubarakshina M. M., Khorobrykh S. A., Kozuleva M. A., and Ivanov B. N. Intramembrane Formation of Hydrogen Peroxide during Oxygen Reduction in Thylakoids of Higher Plants. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **408**, 113–116 (2006). DOI: 10.1134/s160767290603001x
 11. Rennenberg A. P., Heinz Photooxidative Stress in Trees. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (CRC Press, 1993). ISBN 978-1-351-07045-4.
 12. Gruszka J., Pawlak A., and Kruk J. Tocochromanols, Plastoquinol, and Other Biological Prenylipids as Singlet Oxygen Quenchers—Determination of Singlet Oxygen Quenching Rate Constants and Oxidation Products. *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 920–928 (2008). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.025
 13. Mubarakshina M., Khorobrykh S., and Ivanov B. Oxygen Reduction in Chloroplast Thylakoids Results in Production of Hydrogen Peroxide inside the Membrane. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1757**, 1496–1503 (2006). DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.09.004
 14. Ivanov B., Mubarakshina M., and Khorobrykh S. Kinetics of the Plastoquinone Pool Oxidation Following Illumination. *FEBS Lett.*, **581**, 1342–1346 (2007). DOI: 10.1016/j.febslet.2007.02.044
 15. Vetoshkina D. V., Ivanov B. N., Proskuryakov I. I., and Borisova-Mubarakshina M. M. Involvement of the Chloroplast Plastoquinone Pool in the Mehler Reaction. *Physiol. Plantarum*, **161** (1), 45–55 (2017). DOI: 10.1111/pp1.12560
 16. Borisova-Mubarakshina M. M., Naydov I. A., and Ivanov B. N. Oxidation of the Plastoquinone Pool in Chloroplast Thylakoid Membranes by Superoxide Anion Radicals. *FEBS Lett.*, **592**, 3221–3228 (2018). DOI: 10.1002/1873-3468.13237
 17. Kruk J. and Trebst A. Plastoquinol as a Singlet Oxygen Scavenger in Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1777**, 154–162 (2008). DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.10.008
 18. Ferretti U., Ciura J., Ksas B., Rác M., Sedlářová M., Kruk J., Havaux M., and Pospíšil P. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Plastoquinols and Their Oxidation Products in Arabidopsis. *Plant J.*, **95**, 848–861 (2018). DOI: 10.1111/tj.13993
 19. Khorobrykh S. and Tyystjärvi E. Plastoquinol Generates and Scavenges Reactive Oxygen Species in Organic Solvent: Potential Relevance for Thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1859**, 1119–1131 (2018). DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.07.003
 20. Hundal T., Forsmark-Andrée P., Ernster L., and Andersson B. Antioxidant Activity of Reduced Plastoquinone in Chloroplast Thylakoid Membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 117–122 (1995). DOI: 10.1006/abbi.1995.9920
 21. Maciejewska U., Polkowska-Kowalczyk L., Swiezewska E., and Szkopinska A. Plastoquinone: Possible Involvement in Plant Disease Resistance. *Acta Biochim. Pol.*, **49**, 775–780 (2002). DOI:024903775
 22. Szymańska R. and Kruk J. Plastoquinol Is the Main Prenylipid Synthesized During Acclimation to High Light Conditions in Arabidopsis and Is Converted to Plastocholesterol by Tocopherol Cyclase. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 537–545 (2010). DOI: 10.1093/pcp/pcq017
 23. Kruk J., Kubasik-Kladna K., and Aboul-Enein H. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**, 241–257 (2016).
 24. Lichtenthaler H. K. Biosynthesis, Accumulation and Emission of Carotenoids, α -Tocopherol, Plastoquinone, and Isoprene in Leaves under High Photosynthetic Irradiance. *Photosynth. Res.*, **92**, 163–179 (2007). DOI: 10.1007/s11120-007-9204-y
 25. Ksas B., Alric J., Caffarri S., and Havaux M. Plastoquinone Homeostasis in Plant Acclimation to Light Intensity. *Photosynth. Res.*, **152**, 43–54 (2022). DOI: 10.1007/s11120-021-00889-1
 26. Falk J., Andersen G., Kernebeck B., and Krupinska K. Constitutive Overexpression of Barley 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase in Tobacco Results in Elevation of the Vitamin E Content in Seeds but Not in Leaves 1. *FEBS Lett.*, **540**, 35–40 (2003). DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00166-2
 27. Ksas B., Becuwe N., Chevalier A., and Havaux M. Plant Tolerance to Excess Light Energy and Photooxidative Damage Relies on Plastoquinone Biosynthesis. *Sci. Rep.*, **5**, 10919 (2015). DOI: 10.1038/srep10919
 28. Afanas'ev I. B. *Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications* (CRC Press, 1991). ISBN 978-0-8493-5452-6.
 29. Khorobrykh S. A. and Ivanov B. N. Oxygen Reduction in a Plastoquinone Pool of Isolated Pea Thylakoids. *Photosynth. Res.*, **71**, 209–219 (2002). DOI: 10.1023/A:1015583502345
 30. Khorobrykh S., Mubarakshina M., and Ivanov B. Photosystem I Is Not Solely Responsible for Oxygen Reduction in Isolated Thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1657**, 164–167 (2004). DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.04.009
 31. Kozuleva M. A., Petrova A. A., Mamedov M. D., Semenov A. Yu., and Ivanov B. N. O₂ Reduction by Photosystem I Involves Phylloquinone under Steady-State Illumination. *FEBS Lett.*, **588**, 4364–4368 (2014). DOI: 10.1016/j.febslet.2014.10.003
 32. Kozuleva M. A. and Ivanov B. N. Superoxide Anion Radical Generation in Photosynthetic Electron Transport Chain. *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1045–1060 (2023). DOI: 10.1134/S0006297923080011
 33. McCauley S. W. and Melis A. Quantitation of Plastoquinone Photoreduction in Spinach Chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **8**, 3–16 (1986). DOI: 10.1007/BF00028472
 34. Kruk J. and Strzałka K. Dark Reoxidation of the Plastoquinone-Pool Is Mediated by the Low-Potential

- Form of Cytochrome b-559 in Spinach Thylakoids. *Photosynth. Res.*, **62**, 273–279 (1999). DOI: 10.1023/A:1006374319191
35. Rich P. R. and Harper R. Partition Coefficients of Quinones and Hydroquinones and Their Relation to Biochemical Reactivity. *FEBS Lett.*, **269**, 139–144 (1990). DOI: 10.1016/0014-5793(90)81139-F
 36. Tullberg A., Alexiev K., Pfannschmidt T., and Allen J. F. Photosynthetic Electron Flow Regulates Transcription of the *psaB* Gene in Pea (*Pisum Sativum* L.) Chloroplasts Through the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1045–1054 (2000). DOI: 10.1093/pcp/pcd031
 37. Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G. E. New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes. *Photosynth. Res.*, **79**, 209 (2004). DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d
 38. Tóth S. Z., Schansker G., and Strasser R. J. A Non-Invasive Assay of the Plastoquinone Pool Redox State Based on the OJIP-Transient. *Photosynth. Res.*, **2007**, **93**, 193–203 (2004). DOI: 10.1007/s11120-007-9179-8
 39. Kalaji H. M., Schansker G., Ladle R. J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S. I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N. I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S. W., Jajoo A., Misra A. N., Nebauer S. G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z. B., Rutkowska B., Serôdio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., and Zivcak M. Frequently Asked Questions about in Vivo Chlorophyll Fluorescence: Practical Issues. *Photosynth. Res.*, **122**, 121–158 (2014). DOI: 10.1007/s11120-014-0024-6
 40. Kruk J., Jemioła-Rzemińska M., Burda K., Schmid G. H., and Strzałka K. Scavenging of Superoxide Generated in Photosystem I by Plastoquinol and Other Prenylipids in Thylakoid Membranes. *Biochemistry*, **42**, 8501–8505 (2003). DOI: 10.1021/bi034036q
 41. Khorobrykh S. A., Karonen M., and Tyystjärvi E. Experimental Evidence Suggesting That H₂O₂ Is Produced within the Thylakoid Membrane in a Reaction between Plastoquinol and Singlet Oxygen. *FEBS Lett.*, **589**, 779–786 (2015). DOI: 10.1016/j.febslet.2015.02.011
 42. Maroz A., Anderson R. F., Smith R. A. J., and Murphy M. P. Reactivity of Ubiquinone and Ubiquinol with Superoxide and the Hydroperoxyl Radical: Implications for in Vivo Antioxidant Activity. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 105–109 (2009). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.033
 43. Wardman P. Bioreductive Activation of Quinones: Redox Properties and Thiol Reactivity. *Free Radic. Res. Commun.*, **8**, 219–229 (1990). DOI: 10.3109/10715769009053355
 44. Zhu B.-Z., Zhao H.-T., Kalyanaraman B., and Frei B. Metal-Independent Production of Hydroxyl Radicals by Halogenated Quinones and Hydrogen Peroxide: An ESR Spin Trapping Study. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 465–473 (2002). DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00824-3
 45. Zhu B.-Z., Kalyanaraman B., and Jiang G.-B. Molecular Mechanism for Metal-Independent Production of Hydroxyl Radicals by Hydrogen Peroxide and Halogenated Quinones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17575–17578 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0704030104
 46. Zhu B.-Z., Mao L., Huang C.-H., Qin H., Fan R.-M., Kalyanaraman B., and Zhu J.-G. Unprecedented Hydroxyl Radical-Dependent Two-Step Chemiluminescence Production by Polyhalogenated Quinoid Carcinogens and H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16046–16051 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1204479109
 47. Sanchez-Cruz P., Santos A., Diaz S., and Alegría A. E. Metal-Independent Reduction of Hydrogen Peroxide by Semiquinones. *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 1380–1386 (2014). DOI: 10.1021/tx500089x
 48. Vilyanen D. V., Naydov I., Ivanov B., Kozuleva M., and Borisova-Mubarakshina M. Mechanisms of the Plastoquinone Pool Oxidation in the Dark after Illumination. Available online: <https://www.researchsquare.com> (accessed on 24 January 2024). DOI: 10.21203/rs.3.rs-3025337/v1
 49. Rutherford A. W., Krieger-Liszskay A. Herbicide-Induced Oxidative Stress in Photosystem II. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 648–653 (2001). DOI: 10.1016/s0968-0004(01)01953-3
 50. Neverov K. V. and Krasnovsky Jr A. A. Phosphorescence Analysis of the Chlorophyll Triplet States in Preparations of Photosystem II. *Biophysics*, **49**, 469–474 (2004).
 51. Krieger-Liszskay A. Singlet Oxygen Production in Photosynthesis. *J. Exp. Botany*, **56**, 337–346 (2005). DOI: 10.1093/jxb/erh237
 52. Yadav D. K., Prasad A., Kruk J., and Pospíšil P. Evidence for the Involvement of Loosely Bound Plastosemiquinones in Superoxide Anion Radical Production in Photosystem II. *PLoS One*, **9**, e115466 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0115466
 53. Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K.-I., Endo T., Tasaka M., and Shikanai T. Cyclic Electron Flow around Photosystem I Is Essential for Photosynthesis. *Nature*, **429**, 579–582 (2004). DOI: 10.1038/nature02598
 54. Borisova-Mubarakshina M. M., Vetoshkina D. V., and Ivanov B. N. Antioxidant and Signaling Functions of the Plastoquinone Pool in Higher Plants. *Physiol. Plantarum*, **166**, 181–198 (2019). DOI: 10.1111/pp1.12936
 55. Pshybytko N. L., Kruk J., Kabashnikova L. F., and Strzałka K. Function of Plastoquinone in Heat Stress Reactions of Plants. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1777**, 1393–1399 (2008). DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.08.005
 56. Strzałka K., Szymańska R., Świeżewska E., Skorupińska-Tudek K., and Suwalsky M. Tocochromanols, Plastoquinone and Polyphenols in Selected Plant Species from Chilean Patagonia. *Acta Biol. Cracoviensia. Ser. Botanica*, **51** (2009).

57. Gray G. R., Ivanov A. G., Król M., and Huner N. P. A. Adjustment of Thylakoid Plastoquinone Content and Photosystem I Electron Donor Pool Size in Response to Growth Temperature and Growth Irradiance in Winter Rye (*Secale Cereale* L.). *Photosynth. Res.*, **56**, 209–221 (1998). DOI: 10.1023/A:1006049925042
58. Spicher L., Glauser G., and Kessler F. Lipid Antioxidant and Galactolipid Remodeling under Temperature Stress in Tomato Plants. *Front. Plant Sci.*, **7**, 167 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.00167
59. Griffith M., Elfman B., and Camm E. L. Accumulation of Plastoquinone A during Low Temperature Growth of Winter Rye. *Plant Physiol.*, **74**, 727–729 (1984). DOI: 10.1104/pp.74.3.727
60. Wiciarz M., Niewiadomska E., and Kruk J. Effects of Salt Stress on Low Molecular Antioxidants and Redox State of Plastoquinone and P700 in *Arabidopsis Thaliana* (Glycophyte) and *Eutrema Salsugineum* (Halophyte). *Photosynthetica*, **56**, 811–819 (2018). DOI: 10.1007/s11099-017-0733-0
61. Pilarska M., Niewiadomska E., and Kruk J. Salinity-Induced Changes in Plastoquinone Pool Redox State in Halophytic *Mesembryanthemum Crystallinum* L. *Sci. Rep.*, **13**, 11160 (2023). DOI: 10.1038/s41598-023-38194-7
62. Nosek M., Kornaś A., Kuźniak E., and Miszalski Z. Plastoquinone Redox State Modifies Plant Response to Pathogen. *Plant Physiol. Biochem.*, **96**, 163–170 (2015). DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.028
63. Desikan R., Soheila A.-H., Hancock J. T., and Neill S. J. Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol.*, **127** (1), 159–172 (2001). DOI: 10.1104/pp.127.1.159
64. Apel K. and Hirt H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373–399 (2004). DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
65. Borisova-Mubarakshina M. M., Ivanov B. N., Vetoshkina D. V., Lubimov V. Y., Fedorchuk T. P., Naydov I. A., Kozuleva M. A., Rudenko N. N., Dall'Osto L., Cazzaniga S., and Bassi R. Long-Term Acclimatory Response to Excess Excitation Energy: Evidence for a Role of Hydrogen Peroxide in the Regulation of Photosystem II Antenna Size. *J. Exp. Bot.*, **66**, 7151–7164 (2015). DOI: 10.1093/jxb/erv410
66. Foyer C. H. and Noctor G. Redox Signaling in Plants. *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 2087–2090 (2013). DOI: 10.1089/ars.2013.5278
67. Austin J. R., Frost E., Vidi P.-A., Kessler F., and Staehelin L. A. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. *Plant Cell*, **18**, 1693–1703 (2006). DOI: 10.1105/tpc.105.039859
68. Bréhélin C. and Kessler F. The Plastoglobule: A Bag Full of Lipid Biochemistry Tricks. *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1388–1394 (2008). DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00459.x
69. Pralon T., Collombat J., Pipitone R., Ksas B., Shanmugabalaji V., Havaux M., Finazzi G., Longoni P., and Kessler F. Mutation of the Atypical Kinase ABC1K3 Partially Rescues the Proton Gradient Regulation 6 Phenotype in *Arabidopsis Thaliana*. *Front. Plant Sci.*, **11**, 337 (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00337
70. Ducluzeau A.-L., Wamboldt Y., Elowsky C. G., Mackenzie S. A., Schuurink R. C., and Basset G. J. C. Gene Network Reconstruction Identifies the Authentic Trans-Prenyl Diphosphate Synthase That Makes the Solanesyl Moiety of Ubiquinone-9 in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **69**, 366–375 (2012). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04796.x
71. Block A., Fristedt R., Rogers S., Kumar J., Barnes B., Barnes J., Elowsky C. G., Wamboldt Y., Mackenzie S. A., Redding K., Merchant S. S., and Basset G. J. Functional Modeling Identifies Paralogous Solanesyl-Diphosphate Synthases That Assemble the Side Chain of Plastoquinone-9 in Plastids*. *J. Biol. Chem.*, **288**, 27594–27606 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.492769
72. Jun L., Saiki R., Tatsumi K., Nakagawa T., and Kawamukai M. Identification and Subcellular Localization of Two Solanesyl Diphosphate Synthases from *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1882–1888 (2004). DOI: 10.1093/pcp/pch211
73. Liu M., Ma Y., Du Q., Hou X., Wang M., and Lu S. Functional Analysis of Polyprenyl Diphosphate Synthase Genes Involved in Plastoquinone and Ubiquinone Biosynthesis in *Salvia Miltiorrhiza*. *Front. Plant Sci.*, **10**, 893 (2019). DOI: 10.3389/fpls.2019.00893
74. Kim S.-E., Bian X., Lee C.-J., Park S.-U., Lim Y.-H., Kim B. H., Park W. S., Ahn M.-J., Ji C. Y., Yu Y., Xie Y., Kwak S.-S., and Kim H. S. Overexpression of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (IbHPPD) Increases Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Sweetpotato Plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **167**, 420–429 (2021). DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.08.025
75. Kim E.-H., Lee Y., and Kim H. U. Fibrillin 5 Is Essential for Plastoquinone-9 Biosynthesis by Binding to Solanesyl Diphosphate Synthases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **27**, 2956–2971 (2015). DOI: 10.1105/tpc.15.00707
76. Kim E.-H., Lee D.-W., Lee K.-R., Jung S.-J., Jeon J.-S., and Kim H. U. Conserved Function of Fibrillin5 in the Plastoquinone-9 Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis* and Rice. *Front. Plant Sci.*, **8** (2017). DOI: 10.3389/fpls.2017.01197
77. Santos-Pirath I. M., Walter L. O., Maioral M. F., Philippus A. C., Zatelli G. A., Horta P. A., Colepicolo P., Falkenberg M. D. B., and Santos-Silva M. C. Apoptotic Events Induced by a Natural Plastoquinone from the Marine Alga *Desmarestia Menziesii* in Lymphoid Neoplasms. *Exp. Hematol.*, **86**, 67–77.e2 (2020). DOI: 10.1016/j.exphem.2020.05.003
78. Iwashima M., Mori J., Ting X., Matsunaga T., Hayashi K., Shinoda D., Saito H., Sankawa U., and Hayashi T. Antioxidant and Antiviral Activities of Plastoquinones from the Brown Alga *Sargassum Micracanthum*, and a New Chromene Derivative Converted

- from the Plastoquinones. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 374–377 (2005). DOI: 10.1248/bpb.28.374
79. Mori J., Iwashima M., Wakasugi H., Saito H., Matsunaga T., Ogasawara M., Takahashi S., Suzuki H., and Hayashi T. New Plastoquinones Isolated from the Brown Alga, *Sargassum Micracanthum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **53**, 1159–1163 (2005). DOI: 10.1248/cpb.53.1159
 80. Markovets A. M., Fursova A. Z., and Kolosova N. G. Therapeutic Action of the Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 on Retinopathy in OXYS Rats Linked with Improvement of VEGF and PEDF Gene Expression. *PLoS One*, **6**, e21682 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0021682
 81. Shinn L. J. and Lagalwar S. Treating Neurodegenerative Disease with Antioxidants: Efficacy of the Bioactive Phenol Resveratrol and Mitochondrial-Targeted MitoQ and SkQ. *Antioxidants*, **10**, 573 (2021). DOI: 10.3390/antiox10040573
 82. Isaev N. K., Stelmashook E. V., Genrikhs E. E., Korshunova G. A., Sumbatyan N. V., Kapkaeva M. R., and Skulachev V. P. Neuroprotective Properties of Mitochondria-Targeted Antioxidants of the SkQ-Type. *Rev. Neurosci.*, **27**, 849–855 (2016). DOI: 10.1515/revneuro-2016-0036
 83. Bayrak N., Yıldırım H., Yıldız M., Radwan M. O., Otsuka M., Fujita M., Tuyun A. F., and Ciftci H. I. Design, Synthesis, and Biological Activity of Plastoquinone Analogs as a New Class of Anticancer Agents. *Bioorg. Chem.*, **92**, 103255 (2019). DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103255
 84. Ciftci H. I., Bayrak N., Yıldırım H., Yıldız M., Radwan M. O., Otsuka M., Fujita M., and Tuyun A. F. Discovery and Structure–Activity Relationship of Plastoquinone Analogs as Anticancer Agents against Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Archiv der Pharmazie*, **352**, 1900170 (2019). DOI: 10.1002/ardp.201900170
 85. Janeczko M., Demchuk O. M., Strzelecka D., Kubiński K., and Masłyk M. New Family of Antimicrobial Agents Derived from 1,4-Naphthoquinone. *Eur. J. Med. Chem.*, **124**, 1019–1025 (2016). DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.034
 86. Shrestha J. P., Baker C., Kawasaki Y., Subedi Y. P., Vincent de Paul N. N., Takemoto J. Y., and Chang C. W. T. Synthesis and Bioactivity Investigation of Quinone-Based Dimeric Cationic Triazolium Amphiphiles Selective against Resistant Fungal and Bacterial Pathogens. *Eur. J. Med. Chem.*, **126**, 696–704 (2017). DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.008
 87. Ryu C.-K., Nho J.-H., Jin G., Oh S. Y., and Choi S. J. Synthesis of Benzofuro[6,7-d]Thiazoles, Benzofuro[7,6-d]Thiazoles and 6-Arylamino benzo[d]Thiazole-4,7-Diones as Antifungal Agent. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **62**, 668–674 (2014). DOI: 10.1248/cpb.c14-00146
 88. Tuyun A. F., Yıldız M., Bayrak N., Yıldırım H., Mataracı Kara E., Jannuzzi A. T., and Ozbek Celik B. Discovery of a New Family of Heterocyclic Amine Linked Plastoquinone Analogs for Antimicrobial Evaluation. *Drug Dev. Res.*, **80**, 1098–1109 (2019). DOI: 10.1002/ddr.21591
 89. Davids H., Theunissen R., Chakravorty S., Mohammed R., Frost C., van Otterlo W. A. L., and de Koning C. B. Aminonaphthoquinones as Potential Anti-Breast Cancer Agents. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **6**, 3102–3112 (2012). DOI: 10.5897/AJPP.12.087
 90. Langsjoen P. H. and Langsjoen A. M. Coenzyme Q10 in Cardiovascular Disease with Emphasis on Heart Failure and Myocardial Ischaemia. *Asia Pacific Heart J.*, **7**, 160–168 (1998). DOI: 10.1016/S1328-0163(98)90022-7
 91. Shults C. W. Coenzyme Q10 in Neurodegenerative Diseases. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1917–1921 (2003). DOI: 10.2174/0929867033456882
 92. Ryu H. and Ferrante R. J. Emerging Chemotherapeutic Strategies for Huntington's Disease. *Expert Opin. Emerging Drugs*, **10**, 345–363 (2005). DOI: 10.1517/14728214.10.2.345
 93. Hodges S., Hertz N., Lockwood K., and Lister R. Co-Q₁₀: Could It Have a Role in Cancer Management? *Biofactors*, **9**, 365–370 (1999).
 94. Brea-Calvo G., Rodríguez-Hernández Á., Fernández-Ayala D. J. M., Navas P., and Sánchez-Alcázar J. A. Chemotherapy Induces an Increase in Coenzyme Q10 Levels in Cancer Cell Lines. *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1293–1302 (2006). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.014
 95. Nakazawa H., Ikeda K., Shinozaki S., Yasuhara S., Yu Y.-M., Martyn J. A. J., Tompkins R. G., Yorozu T., Inoue S., and Kaneki M. Coenzyme Q10 Protects against Burn-Induced Mitochondrial Dysfunction and Impaired Insulin Signaling in Mouse Skeletal Muscle. *FEBS Open Biol.*, **9**, 348–363 (2019). DOI: 10.1002/2211-5463.12580
 96. Wu Y., Hao C., Liu X., Han G., Yin J., Zou Z., Zhou J., and Xu C. MitoQ Protects against Liver Injury Induced by Severe Burn plus Delayed Resuscitation by Suppressing the mtDNA-NLRP3 Axis. *Int. Immunopharmacol.*, **80**, 106189 (2020). DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106189
 97. Vilyanen D. V., Pashkevich N. I., Borisova-Mubarakshina M. M., and Osochuk S. S. Pathogenetic Mechanisms of Burn Pathology Associated with Oxidative Membrane Damage and Methods of Their Correction. *Biophysics*, **68**, 129–136 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923010190
 98. Borisova-Mubarakshina M. M., Ivanov B. N., Orekhova N. I., and Osochuk S. S. Antioxidant Properties of Plastoquinone and Prospects of Its Practical Application. *Biophysics*, **63**, 888–894 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918060040

Antioxidant Properties of Plant Plastoquinone *in vivo* and *in vitro***D.V. Vetoshkina*, A.A. Nikolaev*, and M.M. Borisova-Mubarakshina****Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Plastoquinone is a mobile electron carrier from photosystem II to the cytochrome b_6/f complex in the photosynthetic electron transfer chain. In addition, plastoquinone together with many other isoprenoids fulfills antioxidant function, participating in plant defense against reactive oxygen species. This review describes reactions where plastoquinone interacts with the reactive oxygen species including singlet oxygen, superoxide anion radical and hydrogen peroxide in chloroplasts of higher plants. Moreover, a large number of studies investigating the effect of various stress factors on plastoquinone biosynthesis were analyzed and it has been found that the content of plastoquinone increases under almost all stress conditions. Thus, enhancement of the plastoquinone biosynthesis is one of the factors that influence plant sustainability what is necessary in the protection of the photosynthetic apparatus from oxidative degradation. One chapter is devoted to a description of methods for creating plants with the increased level of plastoquinone and to an assessment of the resistance of these plants to environmental factors. Besides, taking into account the high antioxidant activity of plastoquinone and its ability to diffuse in the lipid phase, the ways of practical application of plant plastoquinone as a protector of membrane structures from oxidation are discussed.

Keywords: plastoquinone, reactive oxygen species, antioxidants, stability, higher plants

УДК 578.4 57.018.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЧАСТОТУ ТРАНСДУКЦИИ ПЛАЗМИД БАКТЕРИОФАГОМ RB49

© 2024 г. А.Н. Никулина^{*,#}, Н.А. Никулин^{*}, А.А. Зимин^{*}

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», просп. Науки, 5, Пушкино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: a.karmanova@ibpm.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

T4-родственный бактериофаг RB49, способен осуществлять общую трансдукцию плазмид с относительно высокой частотой. За счет этого механизма бактерии могут приобретать возможности для адаптации к изменяющимся условиям среды и осваивать новые экологические ниши. Исследовано воздействие pH, температуры и облучения длинноволновым ультрафиолетовым светом ($\lambda = 366$ нм) на характеристики препарата фага RB49, содержащего трансдуцирующие частицы с плазмидной ДНК pTurboGFP-V и вирулентные частицы с собственной ДНК. Получены данные об изменениях титра вирулентных частиц и частоты трансдукции плазмиды pTurboGFP-V фагом RB49. После воздействия УФ-излучения в течение 2 ч частота трансдукции плазмиды pTurboGFP-V фагом RB49 выросла в ~3 раза. За 40 мин хранения препарата во льду также отмечался рост частоты трансдукции в несколько раз. На основе полученных экспериментальных данных можно сделать предположение, что трансдуцирующие частицы фага RB49 могут быть более устойчивы к действию длинноволнового УФ-излучения и воздействию температур, близких к 0°C, чем вирулентные, и обеспечивать процесс трансдукции более эффективно, чем при нормальных условиях. Схожие процессы могут происходить и в хорошо освещенных водоемах, в том числе холодных, в которых могут встречаться фаги, родственные RB49. Это может свидетельствовать о возможности более интенсивного горизонтального переноса генов в водных экотопах, чем предполагалось ранее.

Ключевые слова: бактериофаг RB49, трансдукция плазмид, УФ, горизонтальный перенос генов.

DOI: 10.31857/S0006302924030117, EDN: OFBSFW

Бактериофаги – вирусы бактерий – способны эффективно осуществлять горизонтальный перенос генов между своими хозяевами посредством трансдукции. Было показано, что фагоподобные элементы найдены во многих бактериальных геномах и размер таких элементов может составлять до 20% от генетического материала клетки [1, 2].

Например, было установлено, что многие штаммы бактерий приобрели факторы вирулентности и/или патогенности за счет взаимодействия с фагом. К примеру, *E. coli* O157:H7 получила гены шиго-токсина (*stx1* и *stx2*) за счет интеграции в хромосому профагов – 933V и 933W [3, 4].

Фаги ответственны и за приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам. Передача

фагами устойчивости к тетрациклинам, хлорамфениколу, пенициллинам была продемонстрирована у большого числа бактерий: *Salmonella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* [5]. Было показано, что фаги ф80α и фJB способны эффективно переносить плазмиды с генами устойчивости к пенициллину и тетрациклину между штаммами *Staphylococcus aureus* с частотой 10^{-6} – 10^{-5} [6, 7].

На сегодняшний день выделяют три механизма фаговой трансдукции [8]. Первый – специализированная трансдукция, осуществляемая фагами с лизогенным циклом развития. Механизм тесно связан с жизненным циклом фага, в результате неправильного вырезания интегрированного профага из специальных сайтов в ДНК может происходить захват соседних участков бактериального генома с последующей их упаковкой в капсид фага. В результате этого образуются тран-

Сокращение: УФ – ультрафиолетовый.

сдуцирующие частицы, содержащие как фаговую, так и бактериальную ДНК. Специализированная трансдукция ограничивается передачей определенных генов, окружающих место интеграции генома на бактериальной хромосоме. Наследование донорской ДНК в результате специализированной трансдукции может происходить за счет сайт-специфической рекомбинации, опосредованной интегразой фага или же за счет гомологичной рекомбинации. Примером фага, осуществляющим специализированную трансдукцию, является бактериофаг λ .

Второй механизм — генерализованная (общая) трансдукция. Природа данного явления связана с работой терминазы фага — белка, ответственного за узнавание и упаковку генетического материала в собирающуюся вирусную частицу [8]. Отмечается, что генерализованная трансдукция в основном опосредуется фагами рас-типа, упаковывающими ДНК в капсид по механизму «полного заполнения головки» (headfull package). Если на бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной) присутствуют сайты, гомологичные фаговым сайтам узнавания терминазы — псевдо-рас-сайты, то она может быть ошибочно распознана как вирусная и упакована в капсид [8, 9]. Предполагается, что таким образом может быть упакована любая часть генома бактерии и передана от одной клетки к другой. Получающаяся в ходе данного процесса частица является трансдуцирующей (в то время как частица, содержащая фаговую ДНК — вирулентной). Она сохраняет способность к абсорбции на клеточной стенке хозяина и внесение ДНК в его цитоплазму. Попавшая в клетку ДНК может либо интегрироваться в хромосому хозяина за счет процессов рекомбинации, либо же остаться в цитоплазме в случае, если была перенесена плазмидная ДНК [9]. Данный тип трансдукции был хорошо описан для фага *Salmonella sp.* — P22 и фага P1, хозяином которой выступает *E. coli*. Стоит отметить, что генерализованную трансдукцию, в отличие от специализированной и латеральной, могут также осуществлять бактериофаги с литическим циклом развития,

Третий механизм, выделенный относительно недавно — это латеральная трансдукция. Такой тип трансдукции, по всей видимости, более характерен для фагов с лизогенным жизненным циклом. Латеральная трансдукция инициируется на ранних стадиях активации профага — в момент, когда фаг еще интегрирован в хромосому бактерии. Начинается процесс репликации, в результате чего создаются копии фаговой ДНК и окружающей его ДНК хозяина. Часть профагов вырезается из хромосомы и образуют вирулентные частицы, а часть остается интегрированной и содержит при этом большое количество рас-сайтов. Впоследствии они распознаются терминазой

фага, которая будет расщеплять и транслоцировать ДНК в доступные фаговые капсиды, при этом капсид будет содержать смесь фаговой и хромосомной ДНК [10, 11]. Впервые механизм латеральной трансдукции был показан для бактериофагов *Staphylococcus aureus* [8]. Согласно последним исследованиям, бактериофаг P22 может использовать механизм латеральной трансдукции [12]. Отмечается, что латеральная трансдукция, в отличие от двух остальных, имеет скорее направленный характер, т.е. процесс заложен в жизненном цикле фага, а не случаен.

Таким образом, благодаря трансдукции бактерии могут приобретать возможность выживать в неблагоприятных условиях и занимать новые экологические ниши. На данный момент достаточно мало сведений о том, как могут влиять факторы среды на трансдуцирующие частицы и как долго вследствие воздействия этих факторов они могут сохраняться в среде. Данные об устойчивости трансдуцирующих частиц к внешним факторам среды в дальнейшем помогут лучше оценить вклад горизонтального переноса генов, обеспечиваемого бактериофагами, в эволюционные процессы у бактериальных популяций.

Было показано, что ряд T4-родственных бактериофагов, а именно RB42, RB49 и RB43 могут переносить плазмиды между штаммами бактерий достаточно эффективно — частота трансдукции варьировала в зависимости от фага и плазмиды от 10^{-2} до 10^{-6} [13, 14]. Бактериофаги RB43, RB49 и RB42 имеют литический цикл развития и относятся к тому же семейству *Straboviridae* [15], что и T4, не отличаются по морфологии и способу упаковки ДНК, но имеют существенную разницу в геномных последовательностях по сравнению с ним [16]. RB43, RB49 и RB42 имеют большие удлиненные икосаэдрические головки, сокращающийся хвост и фибриллы, размер капсида частиц в пределах 90 нм в ширину и 120 нм в длину [17–19]. Упаковка ДНК в капсид у T4-родственных бактериофагов происходит после сборки капсидов по механизму «полного заполнения головки» и осуществляется за счет комплекса белков, формируемого тремя компонентами: малой терминазой TerS, большой терминазой TerL и порталным белком. TerS распознает вновь реплицированную сильно разветвленную ДНК вирусного генома, представленного конкатемером «голова–хвост». На сегодняшний день не были точно определены последовательности рас-сайтов, распознаваемых TerS, как, например, для классических фагов с упаковкой по рас-типу — SPP1 и P22, т.е. сайт начала упаковки выбирается практически случайно [19]. Специфичность узнавания терминазой собственного генома для исключения генома хозяина из упаковки, по всей видимости, не так важна для некоторых предста-

вителей T4-родственных фагов, в частности, для тех, у кого в составе ДНК встречаются неканонические основания [19]. T4 и большинство родственных ему фагов имеют эндонуклеазы, которые разрушают хозяйскую ДНК с каноническими основаниями и остальные белки, косвенно или прямо участвующие в снижении возможности взаимодействия вируса с ДНК бактерии-хозяина, тем самым обеспечивая заполнение капсида оставшейся в клетке собственной ДНК с различными модификациями. Механизм работает эффективно — T4 дикого типа не способен к горизонтальному переносу генов за счет трансдукции, либо она идет с очень низкой частотой. Экспериментально было показано, что мутанты T4 по генам вышеописанных белков, метаболизма неканонических оснований, с замененным 5'-гидроксиметилцитозин на цитозин способны к общей трансдукции ДНК хозяина (в том числе плазмидной) с высокой частотой. Размер ДНК трансдуцирующих частиц цитозинового мутанта T4 совпал с размером ДНК вирулентной частицы и состоял из конкатемера множественности копий трансдуцируемой плазмиды [20]. Количество копий плазмиды зависит от ее размера, например, трансдуцирующий мутант T4 будет содержать около 38 эквивалентных мономеров pBR322 [20]. Трансдуцирующие частицы также могут содержать только хромосомную ДНК хозяина — имеются данные о частоте трансдукции мутантом фага T4 генов *E. coli*, ответственных за метаболизм сахаров и аминокислот [21]. Для трансдуцирующих частиц мутантных T4 было показано, что они могут нести гибридную ДНК из фаговой и плазмидной, однако такие частицы формируются только в случае, если плазида несет в себе последовательности из фагового генома [22]. Такие частицы могут образовываться за счет механизма репликации, зависимой от рекомбинации, присущей T4-родственным бактериофагам [22]. Механизм упаковки ДНК T4-родственных фагов не предполагает разницы в морфологии капсида у вирулентных и трансдуцирующих частиц, также не ожидается разницы и в плотности упакованной ДНК. На сегодняшний день до конца неизвестны молекулярные механизмы трансдукции, осуществляемой фагами RB43, RB49 и RB42, однако предполагается, что она осуществляется по типу общей трансдукции и схожа по молекулярному механизму с таковой для цитозинового мутанта T4. Предположительно, возможность к формированию трансдуцирующих частиц фагами RB43, RB49 и RB42 связана с отсутствием у них неканонических оснований в составе ДНК и генов, ответственных за их метаболизм. Трансдукция хромосомных генетических детерминант для этих фагов до сих пор не показана.

Нами было замечено, что трансдуцирующие частицы бактериофагов RB42, RB43 и RB49, не-

сущие плазмиды, по всей видимости, могут лучше по сравнению с вирулентными частицами сохраняться при долгосрочном хранении при 5–7°C (неопубликованные данные) и при краткосрочном хранении при 37°C [14]. В опытах с препаратами фагов при указанных температурах мы наблюдали увеличение частоты трансдукции, что и дало основания для данных предположений.

Основные экологические ниши бактериофагов RB42, RB43 и RB49 — это микроорганизмы, обитающие в желудочно-кишечном тракте животных, сточных водах и фекалиях. В данной работе мы провели исследование влияния тех факторов, с которыми бактериофаги RB42, RB49 и RB43 могут сталкиваться в природных условиях, а именно низкая величина pH среды, соответствующая желудочному соку, и длинноволновое ультрафиолетовое (УФ) излучение ($\lambda = 366$ нм), которое входит в состав солнечного спектра и способно достигать поверхности Земли, минуя озоновый слой. Помимо этого, мы проверили и влияние щелочной среды и температур, используемых при пастеризации. Для трансдукции была выбрана плазида pTurboGFP-B, несущая в себе гены устойчивости к двум антибиотикам и ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP-B. Плазида не имеет последовательностей, гомологичных геному фагов RB49, RB42 и RB42, и переносится с частотой порядка 10^{-5} – 10^{-6} при нормальных условиях трансдукции данными фагами *in vitro*. Отсутствие или наличие экспрессии зеленого флуоресцентного белка у клеток-трансдуктанов является хорошим маркером изменений в последовательности плазмидной ДНК, переносимой бактериофагом, что позволяет быстро определять интересующие трансдуктанты для дальнейшего анализа. Основным хозяином для фагов RB49, RB42 и RB42 является *E. coli*. Для трансдукции и развития фагов более удобными для проведения экспериментов являются штаммы с отсутствием систем защиты от чужеродной ДНК, например штаммы без систем рестрикции модификации, поэтому для данной работы был выбран штамм *E. coli* 5K.

Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния температуры, pH и длинноволнового ультрафиолетового излучения на характеристики препарата фага RB49, содержащего вирулентные частицы с собственной ДНК и трансдуцирующие частицы с конкатемером из ДНК плазмиды pTurboGFP-B.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, плазмиды и бактериофаги, используемые в работе. В работе был использован лабораторный штамм *E. coli* 5K ($F^- r^- \kappa m^- \kappa$, *rpsL thr thi leu lacZ*), трансформированный

плазмидой pTurboGFP-B (ЗАО «Евроген», Москва, Россия), в качестве донора плазмидной ДНК для получения трансдуцирующих частиц бактериофага RB49. Плазида pTurboGFP-B несет в себе гены устойчивости к ампициллину, хлорамфениколу и ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP-B (*ampR+*, *cmR+*, *turboGFP* соответственно), является многокопийной. В качестве штамма-реципиента был использован этот же штамм *E. coli* 5К, но без плазмиды.

Трансформация плазмид в бактериальные штаммы. Культуру-реципиент *E. coli* 5К выращивали в течение ночи при 37°C в среде LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) с добавлением 50 мкг/мл стрептомицина. Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli* 5К проводили, как описано в монографии «Молекулярное клонирование» [23]. После трансформации проводили высев на чашку со средой Агар МакКонки-ГРМ (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, пос. Оболенск, Московская обл., Россия) с селективными антибиотиками (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина и 50 мкг/мл стрептомицина). Инкубировали при 37°C в течение ночи. Полученные единичные колонии пересевали несколько раз.

Получение чистого препарата бактериофага RB49. Бактериофаг RB49, полученный из коллекции А.А. Зимина (ФИЦ ПНЦБИ РАН – Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская область, Россия), был микробиологически очищен путем трехкратных пересевов из единичных бляшек с использованием метода агаровых слоев. В качестве хозяина для фага был использован лабораторный штамм *E. coli* 5К. Далее было проведено выращивание бактериофага в объеме 50 мл и его очистка методом изопикнического центрифугирования [24]. Очистку от бактериальных клеток и их обломков проводили центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g, осаждение фаговых частиц – при 10000 g в течение 45 мин в присутствии 10% ПЭГ 6000. Осадок фаговых частиц ресуспендировали в фаговом буфере (200 мМ NaCl, 25 мМ Tris-HCl, pH 8.0). До очистки от клеточных обломков, добавления ПЭГ и после ресуспендирования фаговых частиц добавляли ДНКазу (20 мкг/мл). Для хранения добавляли хлороформ, ДНКазу до 20 мкг/мл и помещали в холодильник на 7°C.

Получение препарата фага RB49, содержащего трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B. Ночную культуру-донор *E. coli* 5К, содержащую плазмиду pTurboGFP-B, добавляли к 50 мл среды LB с добавлением селективных антибиотиков (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина, 50 мкг/мл стрептомицина) и вы-

ращивали при перемешивании в колбе при 37°C до достижения оптической плотности $OD_{590} = 0.5$. Добавляли очищенный бактериофаг RB49 до множественности (отношения количества частиц фага на клетку, т.е. БОЕ/КОЕ) 0.1. Совместное культивирование фага и бактерио-донора плазмиды проводили в течение 2 ч при 37°C, после чего проводили лизис выживших бактерий за счет добавления хлороформа (1/10 от объема культуры). Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g, фильтровали через фильтр с порами диаметром 220 нм, чтобы полностью очистить препарат от клеток. К полученному препарату добавляли ДНКазу до 20 мкг/мл и хранили с добавлением хлороформа.

Для чистоты описанных ниже экспериментов за сутки препарат разбавляли в 10 раз в 0.9% NaCl с добавлением ДНКазы (далее в методах полученный разбавленный препарат упоминается как «препарат фага»). В день проведения опыта у разбавленного препарата определяли частоту трансдукции и титр вирулентных частиц до воздействия на него исследуемого фактора.

Измерение титра бактериофагов. Измерение титра бактериофагов производили по методу агаровых слоев [24]. Из следующих разведений бактериофага: 1:100, 1:10000, 1:1000000, 1:100000000 по отдельности были отобраны по 100 мкл суспензии и добавлены к полужидкой среде LB (концентрация агара 0.6%), содержащей ночную культуру *E. coli* 5К. Полученную смесь наносили на чашки Петри с плотной средой LB. Культивировали в течение суток при 37°C и подсчитывали количество бляшек на каждой чашке и определяли концентрацию фага.

Эксперимент по влиянию pH. Препарат фага распределяли по 1000 мкл в три стеклянные пробирки. В первую пробирку добавляли 5% HCl до конечной концентрации 0.5%, pH 2.0. Во вторую пробирку добавляли 0.2 н NaOH до достижения pH 9.0. Пробу в третьей пробирке оставляли без воздействия кислоты и щелочи (pH 7.0). Все три пробирки оставляли при 37°C на 40 мин. Спустя 30 мин производили реакцию нейтрализации – в случае с HCl добавляли NaOH до достижения нейтрального pH (pH 7.0) и наоборот. Далее проводили определение числа вирулентных частиц и частоты трансдукции для каждого опытного образца.

Эксперимент по влиянию ультрафиолетового излучения. Препарат фага распределяли по 1.5 мл в 8 пластиковых чашек Петри. Четыре чашки Петри подвергали воздействию УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм) в течение 30, 60, 90 и 120 мин, еще 4 чашки оставались в течение тех же временных промежутков в качестве контрольных в полной темноте (т.е. по 1 чашке опытной и 1 контрольной

на временную точку, после воздействия пробу уносили на анализ). В эксперименте была применена система Desaga UVIS (DESAGA, Голландия), в качестве источника УФ-излучения была использована ртутная газоразрядная лампа низкого давления с трубчатой стеклянной колбой мощностью 6 Вт. Длина волны составляла 366 нм. Видимый свет лампы блокировали специальными УФ-фильтрами, предусмотренными конструкцией системы Desaga UVIS. Источник УФ-излучения находился на расстоянии 10 см от образцов. Облученность образцов составляла 1.2 мВт/см². В ходе анализа проводили титрование фага из препарата и трансдукцию. Опыт проводили при комнатной температуре (25°C), значимого изменения температуры в растворе, имитирующем образец, за 2 ч УФ-облучения отмечено не было.

Эксперимент по влиянию температур. Препарат фага распределяли по 1 мл в три пробирки типа Эппендорф. Одну пробирку препарата фага с трансдуцирующими частицами помещали на водяную баню при температуре 65°C, вторую пробирку оставляли при комнатной температуре (25°C), третью помещали в лед. Инкубация происходила в течение 40 мин, затем проводили трансдукцию и титрование фагов из опытных препаратов.

Получение колоний трансдуктантов. 100 мкл препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B (контрольного или подвергнутого воздействию выбранных факторов), смешивали с 100 мкл ночной культуры-реципиента *E. coli* 5K (без плазмиды), инкубировали при комнатной температуре (25°C) в течение 20 мин. Всю полученную смесь наносили на чашку со средой Агар МакКонки-ГРМ с селективными антибиотиками (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина и 50 мкг/мл стрептомицина). Инкубировали при 37°C в течение ночи. Полученные единичные колонии-трансдуктанты пересевали несколько раз для очистки от фага и дальнейшего анализа плазмиды. Для дополнительного контроля и исключения ложноположительных результатов во время каждого проводимого опыта аналогичным образом проводили проверку препарата фага и препарата культуры-реципиента на наличие в них живых и устойчивых к вышеуказанному ряду антибиотиков клеток *E. coli*. Согласно результатам дополнительных контрольных исследований, антибиотикорезистентные бактерии в препаратах фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B и в культуре-реципиенте *E. coli* 5K, до опыта обнаружены не были. Оценку наличия либо отсутствия экспрессии GFP-B у получаемых трансдуктантов проводили путем визуальной проверки

флуоресценции колоний при облучении их синим светом с длиной волны $\lambda \sim 455$ нм.

Расчет частоты трансдукции. В каждом эксперименте частоту трансдукции рассчитывали делением количества трансдуктантных колоний на количество жизнеспособных фаговых частиц. Таким образом, частота трансдукции высчитывалась по формуле [9, 13]:

$$A = C/F,$$

где A – частота трансдукции; C – количество колоний-трансдуктантов, КОЕ в смеси; F – число частиц фага в смеси, БОЕ.

Выделение плазмидной ДНК из трансдуктантов, ее рестрикционный анализ. Плазмиды выделяли методом щелочного лизиса, как описано в монографии [23], из ночной культуры трансдуктантов, выращенной в 5 мл LB с 100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина, 30 мкг/мл стрептомицина при 37°C. Полученные плазмиды из трансдуктантов разделяли в 1% агарозном геле на основе 1×TBE (Tris – 0.1 М, борная кислота – 0.1 М, ЭДТА – 2 мМ, pH 8.0), гель окрашивали бромистым этидием, продукты разделения визуализировали с помощью трансиллюминатора.

Для проведения рестрикционного анализа в пробирку добавляли до 1 мкг плазмидной ДНК трансдуктантов, эндонуклеазы рестрикции PvuII (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия) до 10 единиц активности фермента, до 1× буфера Green (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия), 100 мкг/мл буфера BSA, доводили смесь до 20 мкл деионизованной водой. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Результаты проверяли при помощи электрофореза, методика описана выше.

Статистический анализ. Каждый эксперимент по влиянию физико-химического фактора на препарат фага был проведен дважды. Определение титра фага и частоты трансдукции для каждого образца производили не менее 5 раз. Статистически значимых отличий между результатами двух одинаковых опытов по результатам теста с использованием парного t -критерия Стьюдента найдено не было (p -value < 0.05), в работе представлены данные одного из двух проведенных опытов.

Для вычисления среднего значения, стандартного отклонения и стандартной ошибки в измерениях титра бактериофагов и частоты трансдукции использовали функции MS Excel. В работе представлены вычисления титра фага и частоты трансдукции в формате $\bar{X} \pm SD$ (среднее значение показателя \pm стандартное отклонение). Вычисления нормальности распределения полученных выборок использовали тест Шапиро–Уилка, расчет W -критерия и p -value проводили с исполь-

зованием пакета программных средств R. Для нахождения статистически значимых отличий между показателями титра фага и частоты трансдукции у препаратов, подвергающимся воздействию физико-химических факторов и контрольных препаратов рассчитывали парный *t*-критерий Стьюдента (в некоторых случаях проводили тест Уэлча) и *p*-value для него за счет пакета программных средств R. Статистически значимым результат признавался при *p*-value < 0.05. Визуализацию данных проводили при помощи пакета программного обеспечения ggpubr R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент по влиянию температур. Нами было проведено исследования влияния температур на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B. Исходная концентрация вирулентных частиц в приготовленном нами препарате фага до опыта составляла $(4.95 \pm 3.14) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции до опыта для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.43 \pm 0.47) \cdot 10^{-5}$. В результате 40-минутного воздействия температуры в 65°C на препарат фага число вирулентных частиц упало в ~300000 раз и составляло $(1.63 \pm 1.06) \cdot 10^3$ БОЕ/мл. Частота трансдукции препарата после нагрева снизилась до очень низких значений — мы не получили клетки-трансдуктанты в результате смешения ранее нагретого препарата фага и штамма-реципиента. При комнатной температуре (25°C) титр фага сохранился примерно на том же уровне, что и в начале эксперимента — $(4.69 \pm 2.54) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.10 \pm 0.20) \cdot 10^{-5}$, т.е. можно сказать, что изменений не наблюдалось. После хранения препарата во льду титр фага составлял

$(1.38 \pm 0.80) \times 10^7$ БОЕ/мл, наблюдалось снижение среднего значения титра по сравнению с контрольным образцом, тем не менее оно оставалось в пределах погрешности измерения. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(3.36 \pm 0.73) \cdot 10^{-5}$, среднее значение выросло по сравнению с контрольным в ~2.3 раза, а по сравнению с образцом, хранившимся при комнатной температуре в ~3 раза. Данные представлены в табл. 1. Изменений в морфологии колоний трансдуктантов после температурного воздействия выявлено не было, устойчивость сохранялась ко всем трем антибиотикам, наблюдалась экспрессия зеленого флуоресцентного белка у всех полученных колоний.

Эксперимент по влиянию pH. Нами было исследовано влияние различных значений pH на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B. Концентрация вирулентных фаговых частиц в препарате до опыта составляла $(6.0 \pm 2.0) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K до опыта составляла $(1.53 \pm 0.20) \cdot 10^{-5}$. В этом опыте мы предприняли попытки имитации условий, с которыми могут столкнуться трансдуцирующие частицы в условиях желудочно-кишечного тракта. В результате воздействия HCl на препарат фага в течение 40 мин произошла полная инактивация фаговых частиц. Частота трансдукции препарата снизилась до очень низких значений — мы не получили клетки-трансдуктанты в результате смешения препарата фага после воздействия кислоты и штамма-реципиента. В результате воздействия NaOH на препарат фага в течение 40 мин произошла практически полная инактивация фаговых частиц — титр составлял 30 БОЕ/мл. Как и в предыдущем опыте, частота трансдукции упала до очень низких значений — мы не получили

Таблица 1. Данные об изменениях числа фагов и частоты трансдукции rTurbo-GFP-B бактериофагом RB49 в результате воздействия температур

Воздействия на препарат	Средний титр фага \pm SD, БОЕ/мл	Среднее КОЕ трансдуктантов \pm SD, КОЕ	Средняя частота трансдукции, КОЕ/БОЕ	Стандартное отклонение для частоты трансдукции (SD)	Стандартная ошибка среднего для частоты трансдукции (SE)
25°C	$(4.69 \pm 2.54) \cdot 10^7$	102.80 ± 18.83	$1.10 \cdot 10^{-5}$	$2.00 \cdot 10^{-6}$	$6,31 \cdot 10^{-7}$
0°C	$(1.38 \pm 0.8) \cdot 10^7$	92.80 ± 20.29	$3.36 \cdot 10^{-5}$	$7.34 \cdot 10^{-6}$	$2,32 \cdot 10^{-6}$
65°C	$(1.63 \pm 1.06) \cdot 10^3$	0	0	0	0

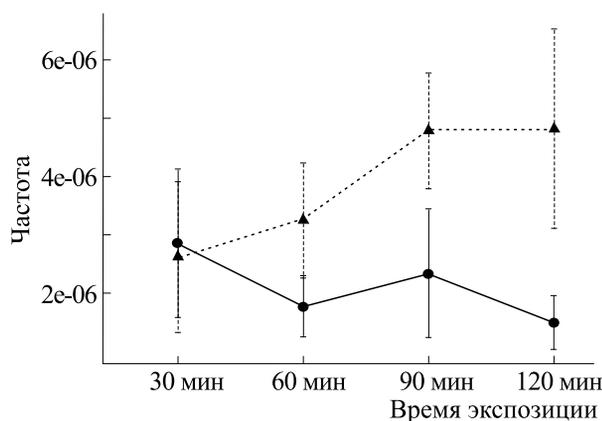


Рис 1. Изменение частоты трансдукции препарата бактериофага RB49 в зависимости от времени экспозиции под УФ-излучением. Треугольниками на графике представлены средние величины частот трансдукций для препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B и подвергнувшегося УФ-излучению ($\lambda = 366$ нм) с разными временными интервалами, кружками — средние величины частот трансдукции для такого же препарата, пребывающего в темноте.

клетки-трансдуктанты в результате смешения препарата фага после воздействия щелочи и штамма-реципиента. При нормальном pH титр фага сохранялся примерно на том же уровне, что и в начале эксперимента — $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.47 \pm 0.30) \cdot 10^{-5}$, то есть какие либо значительные изменения в контрольном эксперименте не наблюдались.

Эксперимент по влиянию УФ-излучения. Нами было проведено исследование воздействия длинноволнового ультрафиолета ($\lambda = 366$ нм) на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B. Исходная концентрация вирулентных частиц в приготовленном нами препарате фага до опыта составляла $(1.04 \pm 0.38) \cdot 10^8$ БОЕ/мл (контрольный образец). Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K до опыта составляла $(2.86 \pm 1.2) \cdot 10^{-6}$. Задачей этого опыта была имитация солнечного излучения, с которым могут столкнуться трансдуцирующие частицы бактериофагов в сточных водах в условиях повышенной инсоляции. При анализе результата воздействия УФ ($\lambda = 366$ нм) на препарат фага с трансдуцирующими частицами была отмечена связь между увеличением времени экспозиции облучения и ростом частоты трансдукции, по сравнению с препаратом, находящимся в темноте. Для препарата, не подвергнувшегося влиянию УФ-излучения, средняя частота трансдукции была практически неизменной в пределах

погрешности измерений. Результаты представлены на рис. 1 в виде графика.

Стоит отметить, что согласно данным проведенного нами парного *t*-теста с критерием Стьюдента для двух групп (применялся для сравнения контрольных и опытных групп спустя 30–90 минут облучения) и *t*-теста с критерием Уэлча (применялся для сравнения контрольной и опытной группы спустя 120 мин облучения), статистически значимое отличие между частотами трансдукции для препаратов, подвергнувшихся и не подвергнувшихся действию УФ-лучей, начинает появляться только после 60 мин облучения препарата (p -value < 0.01). После 30 мин облучения статистически значимой разницы между частотами трансдукции контрольного и опытного препарата не было выявлено (p -value = 0.6985, *t*-тест Стьюдента). Частота трансдукции препарата, облученного в течение 120 мин, для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(4.82 \pm 1.71) \cdot 10^{-6}$, необлученного, оставленного в темноте препарата — $(1.51 \pm 0.45) \cdot 10^{-6}$. Таким образом, за 2 ч облучения УФ ($\lambda = 366$ нм) частота трансдукции препарата выросла в ~3 раза по сравнению с контрольным препаратом, выдержанным в темноте.

Было отмечено падение титра фага с увеличением времени экспозиции, за все время эксперимента (120 мин) средний титр фага упал примерно в ~1.5 раза по сравнению с контрольным образцом — $(6.56 \pm 0.98) \cdot 10^7$ БОЕ/мл и в 1.8 раза по сравнению с образцом, находящимся в темноте в этот же период времени, его титр составил $(1.22 \pm 0.23) \cdot 10^8$ БОЕ/мл. Подробные данные об изменениях титра фага в этих опытах представлены в табл. 2, а данные о количестве трансдуктантов и частоте трансдукции — в табл. 3.

Была проведена оценка изменений морфологии трансдуктантов, полученных за счет препарата фага, подвергнувшегося действию УФ. Визуально детектируемых изменений в морфологии колоний выявлено не было, устойчивость сохранялась ко всем трем селективным антибиотикам, наблюдалась экспрессия зеленого флуоресцентного белка у всех полученных колоний. На рис. 2 представлены фото колоний трансдуктантов, полученных в этой серии опытов.

Из линии трансдуктантов, полученных в результате данного опыта была выделена плазмидная ДНК для изучения возможных изменений. На рис. 3 представлены результаты рестрикционного анализа плазмидной ДНК. Для рестрикционного анализа нами была использована эндонуклеаза рестрикции PvuII (CAGCTG). Выбранная нами плазида несет один сайт узнавания для PvuII, находящийся в области гена устойчивости к хлорамфениколу. Было показано, что во всех клонах-трансдуктантах присутствует плазида,

Таблица 2. Данные об изменениях титра бактериофага RB49 в результате воздействия УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм)

Воздействия на препарат	Время воздействия, мин	Число измерений титра фага (n)	Средний титр, БОЕ/мл	Стандартное отклонение (SD)	Стандартная ошибка среднего (SE)
УФ-излучение	30	10	$1.11 \cdot 10^8$	$1.97 \cdot 10^7$	$6.23 \cdot 10^6$
УФ-излучение	60	10	$7.08 \cdot 10^7$	$1.29 \cdot 10^7$	$4.09 \cdot 10^6$
УФ-излучение	90	10	$8.30 \cdot 10^7$	$1.16 \cdot 10^7$	$3.68 \cdot 10^6$
УФ-излучение	120	10	$6.56 \cdot 10^7$	$9.83 \cdot 10^6$	$3.11 \cdot 10^6$
Без воздействия (нахождение в темноте)	30	10	$1.04 \cdot 10^8$	$3.87 \cdot 10^7$	$1.19 \cdot 10^7$
Без воздействия (нахождение в темноте)	60	10	$1.06 \cdot 10^8$	$2.84 \cdot 10^7$	$8.97 \cdot 10^6$
Без воздействия (нахождение в темноте)	90	10	$1.18 \cdot 10^8$	$3.19 \cdot 10^7$	$1.01 \cdot 10^7$
Без воздействия (нахождение в темноте)	120	10	$1.22 \cdot 10^8$	$2.35 \cdot 10^7$	$7.42 \cdot 10^6$

Таблица 3. Данные об изменениях частоты трансдукции рTurbo-GFP-В бактериофагом RB49 в результате воздействия УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм)

Воздействия на препарат	Время воздействия, мин	Число измерений (n)	Среднее КОЕ трансдуктантов \pm SD, КОЕ	Средняя частота трансдукции, КОЕ/БОЕ	Стандартное отклонение для частоты трансдукции (SD)	Стандартная ошибка среднего для частоты трансдукции (SE)
УФ-излучение	30	10	29.20 ± 14.24	$2.63 \cdot 10^{-6}$	$1.28 \cdot 10^{-6}$	$4.06 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	60	10	23.00 ± 7.01	$3.25 \cdot 10^{-6}$	$9.90 \cdot 10^{-7}$	$3.13 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	90	10	39.60 ± 8.14	$4.77 \cdot 10^{-6}$	$9.81 \cdot 10^{-7}$	$3.10 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	120	10	31.60 ± 11.19	$4.82 \cdot 10^{-6}$	$1.71 \cdot 10^{-6}$	$5.39 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	30	10	29.70 ± 13.26	$2.86 \cdot 10^{-6}$	$1.27 \cdot 10^{-6}$	$4.03 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	60	10	18.90 ± 5.40	$1.78 \cdot 10^{-6}$	$5.10 \cdot 10^{-7}$	$1.61 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	90	10	27.70 ± 13.07	$2.35 \cdot 10^{-6}$	$1.11 \cdot 10^{-6}$	$3.50 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	120	10	18.40 ± 5.46	$1.51 \cdot 10^{-6}$	$4.48 \cdot 10^{-7}$	$1.42 \cdot 10^{-7}$

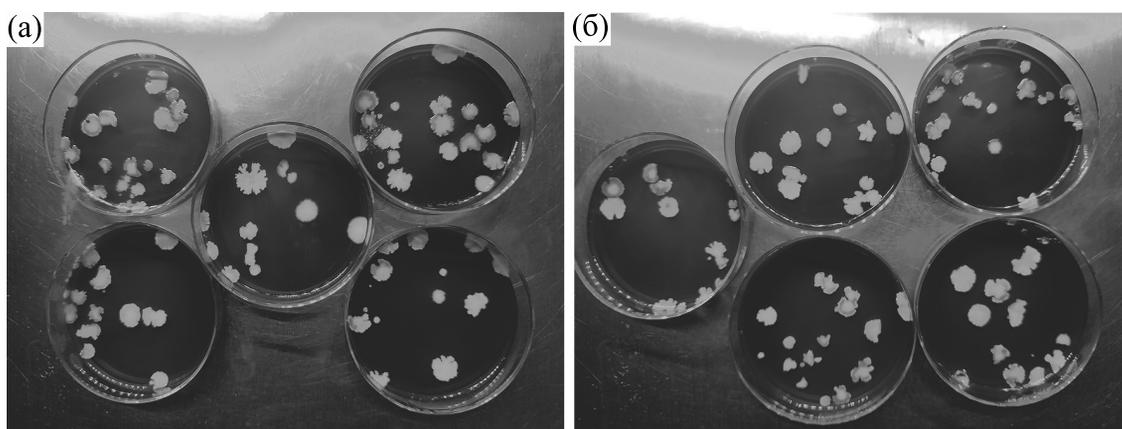


Рис 2. (а) – Колонии трансдуктантов *E. coli* 5К, полученные за счет действия находившегося в течение 120 мин в темноте препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами, несущими плазмиду рTurboGFP-В. (б) – Колонии трансдуктантов *E. coli* 5К, полученные за счет действия находившегося в течение 120 мин под действием УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм) препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами, несущими плазмиду рTurboGFP-В. Для выявления флуоресценции использовали лампу, излучающую синий свет ($\lambda \sim 455$ нм).

имеющая в линейаризованной форме ожидаемый размер пределах 4000 п.н. Однако плазмидная ДНК, выделенная из клон-трансдуктанта, полученного за счет трансдукции препаратом, облученным в течение 2 ч, по всей видимости, не полностью гидролизовалась под действием рестрик-

тазы (рис. 3, образец 5). На геле мы наблюдали дополнительную полосу длиной 8000 п.н., что соответствует длине димера данной плазмиды. Вероятно, это может быть связано с появлением большого количества фотопродуктов в плазмидной ДНК и их последующей репарацией, приво-

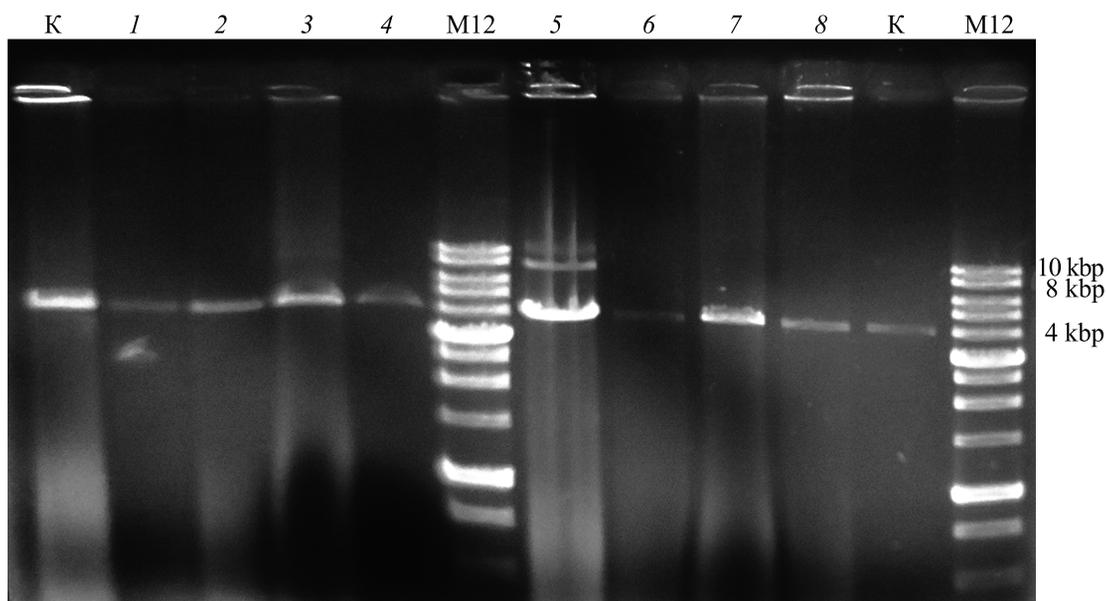


Рис 3. Результаты рестрикционного анализа плазмид рTurboGFP-В, выделенных из трансдуктантов *E. coli* 5К. 1-4 плазмидная ДНК рTurboGFP-В, выделенная из трансдуктантов *E. coli* 5К, полученных за счет действия находившегося в темноте препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами в течение 30 мин (дорожка 1), 60 мин (дорожка 2), 90 мин (дорожка 3), 120 мин (дорожка 4). Дорожки 5–8 – плазмидная ДНК рTurboGFP-В, выделенная из трансдуктантов *E. coli* 5К, полученных за счет действия облученного УФ ($\lambda = 366$ нм) препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами в течение: 120, 90, 60 и 30 мин соответственно. Дорожки «К» (контроль) – плазмидная ДНК из штамма 5К/рTurboGFP-В, на основе которого были получены трансдуцирующие частицы RB49. Дорожки «М12» – ДНК-маркер М12 (SybEnzyme, Россия). Рестрикционный анализ проводили эндонуклеазой рестрикции PvuII. Плазмида имеет один сайт для рестриктазы PvuII, что позволяет привести плазмиду к линейной форме и оценить ее размер. Размер полученных фрагментов в пределах 4000 п.н., что соответствует размеру плазмиды рTurboGFP-В

дящей к заменам нуклеотидов, в том числе и в сайтах рестриктазы PvuII.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами был проведен ряд опытов по воздействию физико-химических факторов, с которыми бактериофаги RB49 могут столкнуться, находясь в одной из своих ниш обитания. Ранее подобные опыты с использованием данной группы бактериофагов не проводились, наши эксперименты являются первыми.

На основании полученных данных мы предполагаем, что трансдуцирующие частицы фага RB49, содержащие плазмиду pTurboGFP-B, хуже сохраняются при температуре 60°C и выше. Это может быть обусловлено несколькими причинами. Первая – небольшое количество трансдуцирующих частиц в составе препарата – согласно расчетам, исходя из частоты трансдукции, в препарате должно быть не менее 100 частиц в 1 мл. Температура в 65°C способна привести к разрушению такого небольшого количества фаговых капсидов за использованный нами временной интервал, вне зависимости от того, какая ДНК в них упакована. Вторая причина может быть связана со структурой самих частиц – возможно, трансдуцирующая частица фага RB49 с упакованным в нее конкатемером из плазмид менее стабильна, чем вирулентная. Проверить это предположение можно будет при помощи схожего опыта – но подвергать воздействию температуры нужно будет равное количество трансдуцирующих и вирулентных частиц, полностью очищенных друг от друга. Мы предполагаем, что использованный нами метод нагрева на водяной бане с температурой, близкой к температуре пастеризации, можно будет использовать для полной очистки препарата от трансдуцирующих частиц.

Интересен результат, полученный для препарата, хранящегося во льду. Мы наблюдали незначительное снижение титра вирулентных частиц фага RB49, при возросшей частоте трансдукции. Мы пока не можем точно сказать, что в условиях, близких к 0°C, трансдуцирующие частицы будут лучше сохраняться, однако, согласно нашим неопубликованным данным, подобные препараты фага RB43 с плазмидой pBR322, хранящиеся при температуре 5–7°C в течение нескольких лет, имеют тенденцию к увеличению частоты трансдукции и снижению титра вирулентных частиц в долгосрочной временной перспективе.

На основании опытов по воздействию NaOH и HCl на препарат фага мы предполагаем, что трансдуцирующие частицы RB49 с плазмидой pTurboGFP-B не сохраняются при воздействии щелочного pH (9.0 и более), оба типа частиц в препарате с концентрацией 10^7 БОЕ/мл и ниже могут

инактивироваться в условиях желудочного сока за 40 мин. По всей видимости, бактериофаг RB49 менее устойчив к изменениям pH по сравнению с другим представителем T4-родственных бактериофагов – исследованным ранее фагом T4 [25]. Возможно, это связано с отличиями в структуре белков капсида этих фагов.

На основе полученных экспериментальных данных о влиянии УФ-излучения на препарат фага с трансдуцирующими частицами можно сделать предположение о том, что трансдуцирующие частицы RB49, несущие плазмиду pTurboGFP-B, могут быть более устойчивы к действию длинноволнового УФ-излучения, чем вирулентные частицы RB49. Результат рестрикционного анализа облученной плазмидной ДНК из трансдуктантов не так однозначен. Нами было замечено, что плазмидная ДНК, выделенная из трансдуктантов, полученных за счет облученного УФ в течение 2 ч препарата фага, гидролизовалась не полностью. Возможно, это связано с избыточностью субстрата для фермента и за 2 ч часть ДНК не успела перейти в линейную форму. Также объяснением этого результата может быть то, что спустя 2 ч облучения плазмидная ДНК в трансдуцирующих частицах получает достаточное количество фотоповреждений для того, чтобы стать более устойчивой к действию эндонуклеаз рестрикции. В ранних исследованиях было отмечено, что существует корреляция между степенью повреждения УФ-излучением плазмидной ДНК и ее устойчивостью к действию рестриктаз [26]. В нуклеиновых кислотах наиболее легко при действии длинноволнового УФ-излучения окисляется гуанин (G), образуя 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксо-G) и другие продукты [27]. Сайт узнавания выбранной нами эндонуклеазы рестрикции PvuII содержит несколько гуанинов, которые вполне могли бы образовать упомянутые выше фотопродукты. После того, как поврежденная плазмидная ДНК попадет в клетку из трансдуцирующей частицы, может запуститься процесс репарации полученных фотоповреждений. Репарация может протекать с ошибками, это в свою очередь может привести к небольшому изменению нуклеотидного состава и потере сайта узнавания, выбранной нами рестриктазы PvuII. Как следствие, часть выделенной нами плазмидной ДНК не смогла гидролизоваться во время проведения рестрикционного анализа. Стоит отметить, что трансдуктанты, полученные за счет частиц, подвергавшихся облучению в течение 2 ч, сохраняли способность к росту на селективной среде с добавлением антибиотиков и флуоресцировали в синем свете. Следовательно, сохранилась экспрессия генов антибиотикорезистентности и зеленого флуоресцентного белка с поврежденной плазмидной ДНК из облученной трансдуцирующей частицы. Для подтверждения нашей гипоте-

зы о фотоповреждениях ДНК в трансдуцирующих частицах необходимо проводить дальнейшее исследование выделенной плазмидной ДНК из трансдуктантов, включая повторный рестрикционный анализ в том числе с использованием других эндонуклеаз рестрикции.

На основе совокупности этих данных, мы предполагаем, что устойчивость трансдуцирующих частиц к УФ-излучению скорее всего связана с большим числом копий плазмид в капсиде. Длина плазмиды рTurboGFP-V составляет 4100 п.н., тогда как капсид фага RB49 может вместить в себя до 164018 п.н. в соответствии с длиной своего генома. Следовательно, в трансдуцирующей частице фага RB49 может находиться около 40 мономерных копий плазмиды рTurboGFP-V. Большое число копий плазмидной ДНК позволяет лучше сохранить и реализовать генетическую информацию, переносимую трансдуцирующей частицей, в отличие от вирулентной, где содержится лишь одна копия вирусного генома. Тем не менее, с увеличением дозы мутагенного фактора чаще происходит и накопление мутаций в последовательности. В зависимости от работы систем репарации клетки, количества и типа повреждений, будет зависеть, как будет идти экспрессия генов, которую внесла в клетку трансдуцирующая частица. В случае нашего эксперимента доза длинноволнового УФ-излучения, накопленная за 2 ч, недостаточна, чтобы полностью нарушить экспрессию генов антибиотикорезистентности и зеленого флуоресцентного белка, но достаточна для того, чтобы часть сайтов стала недоступной для распознаваний ими рестриктаз. Можно сказать, что трансдуцирующие частицы фагов, содержащие хозяйскую ДНК (в частности конкатемер из десятков копий плазмид) вместо собственной, являются неким «защищенным хранилищем» информации, получаемой от бактерии-хозяина, которую они могут передать новому штамму-реципиенту. При этом за счет большого количества копий передаваемой информации, бактерия-реципиент с большей вероятностью приобретет новый признак по сравнению с другими механизмами горизонтального переноса генов. Таким образом, вклад фагов, способных к генерализованной трансдукции, в горизонтальный перенос генов и коэволюцию бактерий-хозяев в хорошо освещенных водных экотопах может быть выше, чем предполагалось ранее. Описанные нами выше процессы могут происходить в хорошо освещенных водоемах, в которые попадают фекальные сточные воды, в которых, в свою очередь, могут встречаться фаги, родственные RB49.

ВЫВОДЫ

На основе проведенной нами серии экспериментов, мы предполагаем, что при определенных

условиях — температура, близкая к 0°C, и повышенная инсоляция — трансдуцирующие частицы могут достаточно хорошо сохраняться и обеспечивать процесс трансдукции не менее эффективно, чем при нормальных условиях. Эти данные могут свидетельствовать о возможности более интенсивного горизонтального переноса генов в водных экотопах посредством фаговой трансдукции, чем предполагалось ранее. Более того, за счет большей устойчивости в вышеописанных условиях, трансдуцирующие частицы могут быть «резервуаром» для хранения большого объема генетической информации в течение долгого времени, скорее всего, это свойство определяется количеством и множественностью копий генетического материала, упакованного в капсид фага.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-26-00205, <https://rscf.ru/project/24-26-00205/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernández L., González S., Quiles-Puchalt N., Gutiérrez D., Penadés J. R., García P., and Rodríguez A. Lysogenization of *Staphylococcus aureus* RN450 by phages ϕ 11 and ϕ 80 α leads to the activation of the SigB regulon. *Sci. Rep.*, **8** (1), 12662 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-31107-z
2. Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, **49**, 277–300 (2003). DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x.
3. Plunkett G. 3rd, Rose D. J., Durfee T. J., and Blattner F. R. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.*, **181** (6), 1767–1778 (1999). DOI: 10.1128/JB.181.6.1767-1778.1999
4. Howard-Varona C., Vik D. R., Solonenko N. E., Li Y. F., Gazitua M. C., Chittick L., Samiec J. K., Jensen A. E., Anderson P., Howard-Varona A., Kinkhabwala A. A., Abedon S. T., and Sullivan M. B. Fighting Fire with Fire: Phage Potential for the Treatment of *E. coli* O157 Infection. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **7** (4), 101 (2018). DOI: 10.3390/antibiotics7040101

5. Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg. Microbes Infect.*, **7** (1), 168 (2018). DOI: 10.1038/s41426-018-0169-z
6. Varga M., Pantu Ček R., Ru Žičková V., and Doškař J. Molecular characterization of a new efficiently transducing bacteriophage identified in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Virol.*, **97** (1), 258–268 (2016). DOI: 10.1099/jgv.0.000329
7. Varga M., Kuntová L., Pantůček R., Mašláňová I., Růžičková V., and Doškař J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.*, **332** (2), 146–152 (2012). DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02589.x
8. Chiang Y. N., Penadés J. R., and Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog.*, **15** (8) (2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007878
9. Thierauf A., Perez G., and Maloy A. S. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.*, **501**, 267–286 (2009). DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_23
10. Humphrey S., Fillol-Salom A., Quiles-Puchalt N., Ibarra-Chávez R., Haag A. F., Chen J. and Penadés J. R. Bacterial chromosomal mobility via lateral transduction exceeds that of classical mobile genetic elements. *Nature Commun.*, **12** (1), 6509 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26004-5
11. Fillol-Salom A., Bacigalupe R., Humphrey S., Chiang Y. N., Chen J., and Penadés J. R. Lateral transduction is inherent to the life cycle of the archetypical *Salmonella* phage P22. *Nature Commun.*, **12** (1), 6510 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26520-4
12. Chiang Y. N., Penadés J. R., and Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog.*, **15** (8) (2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007878
13. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Shlyapnikov M. G., and Boronin A. M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages. *Rus. J. Genet.*, **39**, 761–772 (2003). DOI: 10.1023/A:1024748903232
14. Никулина А. Н., Зимин А. А. и Коцаев А. Г. Изучение влияния температуры на трансдукционную способность и литическую активность бактериофагов RB43 и RB49. *Труды Кубанского гос. аграрного ун-та*, **101**, 283–292 (2022). DOI: 10.21515/1999-1703-101-283-292
15. Simmonds P., Adriaenssens E. M., Zerbini F. M., Abrescia N. G. A., Aiewsakun P., Alfnas-Zerbini P., Bao Y., Barylski J., Drosten Ch., Duffy S., Duprex W. P., Dutilh B. E., Elena S. F., García M. L., Junglen S., Katzourakis A., Koonin E. V., Krupovic M., Kuhn J. H., Lambert A. J., Lefkowitz E. J., Łobocka M., Lood C., Mahony J., Meier-Kolthoff J. P., Mushegian A. R., Oksanen H. M., Poranen Minna M., Reyes-Muñoz A., Robertson D. L., Roux S., Rubino L., Sabanadzovic S., Siddell S., Skern T., Smith D. B., Sullivan M. B., Suzuki N., Turner D., Van Doorslaer K., Vandamme A.-M., Varsani A., and Vasilakis N. Four principles to establish a universal virus taxonomy. *PLoS Biol.*, **21** (2), e3001922 (2023). DOI: 10.1371/journal.pbio.3001922
16. Monod C., Repoila F., Kutateladze M., Tétart F., and Krisch, H. M. The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4. *J. Mol. Biol.*, **267** (2), 237–249 (1997). DOI: 10.1006/jmmb.1996.0867
17. Gao S., Zhang L., and Rao V. B. Exclusion of small terminase mediated DNA threading models for genome packaging in bacteriophage T4. *Nucl. Acids Res.*, **44** (9), 4425–4439 (2016). DOI: 10.1093/nar/gkw184
18. Gao S. and Rao V. B. Specificity of interactions among the DNA-packaging machine components of T4-related bacteriophages. *J. Biol. Chem.*, **286** (5), 3944–3956 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M110.196907
19. Rao V.B., Fokine A., Fang Q., and Shao Q. Bacteriophage T4 head: structure, assembly, and genome packaging. *Viruses*, **15** (2), 527 (2023). DOI: 10.3390/v15020527
20. Takahashi H. and Saito H. Mechanism of pBR322 transduction mediated by cytosine-substituting T4 bacteriophage. *Mol. Gen. Genet.*, **186** (4), 497–500 (1982). DOI: 10.1007/BF00337955
21. Wilson G. G., Young K. Y., Edlin G. J., and Konigsberg W. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature*, **280** (5717), 80–82 (1979). DOI: 10.1038/280080a0
22. Kreuzer K. N. and Alberts B. M. Characterization of a defective phage system for the analysis of bacteriophage T4 DNA replication origins. *J. Mol. Biol.*, **188** (2), 185–198 (1986). DOI: 10.1016/0022-2836(86)90303-7
23. Маниатис Т., Фрич Э. и Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование* (Мир, М., 1984).
24. Jofre J. and Muniesa M. Bacteriophage Isolation and Characterization: Phages of *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.*, **2075**, 61–79 (2020). DOI: 10.1007/978-1-4939-9877-7_4
25. Majewska J., Miernikiewicz P., Szymczak A., Kaźmierczak Z., Goszczyński T. M., Owczarek B., Rybicka I., Ciekot J., and Dąbrowska K. Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors. *Microbiol. Spectrum*, **11** (5), e00115-23 (2023). DOI: 10.1128/spectrum.00115-23
26. Kejnovský E., Nejedlý K., and Kypr J. Factors influencing resistance of UV-irradiated DNA to the restriction endonuclease cleavage. *Int. J. Biol. Macromol.*, **34** (3), 213–222 (2004). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2004.04.004
27. Nelson K. L., Boehm A. B., Davies-Colley R. J., Dodd M. C., Kohn T., Linden K. G., Liu Yu., Maraccini P. A., McNeill K., Mitch W. A., Nguyen Th. H., Parker K. M., Rodriguez R. A., Sassoubre L. M., Silverman A. I., Wigginton K. R., and Zepp R. G. Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. *Environ. Sci. Process Impacts*, **20** (8), 1089–1122 (2018). DOI: 10.1039/c8em00047f

Study of the Influence of Physicochemical Factors on Frequency of Plasmid Transduction by Bacteriophage RB49

A.N. Nikulina*, N.A. Nikulin*, and A.A. Zimin*

**G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The T4-related bacteriophage RB49 is capable of generalized transduction of plasmids at a relatively high frequency. Due to this mechanism, bacteria can obtain the ability to adapt to varying environmental conditions and survive in new ecological niches. The effect of pH, temperature and long-wave ultraviolet irradiation ($\lambda = 366$ nm) on the characteristics of the RB49 phage preparation containing transducing particles with pTurboGFP-B plasmid DNA and virulent particles which have their own DNA. The data were obtained for the changes in the titer of virulent particles and the frequency of transduction of the pTurboGFP-B plasmid by the RB49 phage. Two hours after exposure of the pTurboGFP-B plasmid to UV radiation, the frequency of plasmid transduction by the RB49 phage increased by a factor of ~ 3 . Also, after 40 min storage of the phage in ice, the number of transducing particles produced was many folds greater. Based on the data gathered in the experiment, it is suggested that transducing particles of the RB49 phage can be more resistant to long-wave UV radiation and temperatures close to 0°C than virulent particles and are able to provide the transduction process more effectively than under normal conditions. Similar processes may occur in well-lit water bodies including cold-water reservoirs where the phages related to RB49 can be found. This might be an indication of the potential of more intense horizontal gene transfer in aquatic ecotopes than previously thought.

Keywords: bacteriophage RB49, plasmid transduction, UV, horizontal gene transfer

УДК 577.332.23:539.199

ЭФФЕКТЫ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ, ГИСПИДИНА И ОБНАРУЖЕННОГО СТИМУЛИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА НА СВЕЧЕНИЕ МИЦЕЛИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БАЗИДИОМИЦЕТА

Neonothopanus nambi

© 2024 г. Н.О. Ронжин^{*,#}, Е.Д. Посохина^{*}, В.М. Ле^{**}, О.А. Могильная^{*}, Ю.В. Захарова^{***}, А.С. Сухих^{**}, В.С. Бондарь^{*}

^{*}Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

^{**}Кемеровский государственный университет, Красная ул., 6, Кемерово, 650000, Россия

^{***}Кемеровский государственный медицинский университет, ул. Ворошилова, 22а, Кемерово, 650056, Россия

[#]E-mail: roniol@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

In vivo установлено, что добавки кофейной кислоты и обнаруженного нами низкомолекулярного стимулятора биолюминесценции к мицелию светящегося гриба *Neonothopanus nambi* приводят к быстрому и значительному (на порядок и более) увеличению интенсивности его световой эмиссии. Высказано предположение, что наблюдаемый эффект активации грибного свечения может быть опосредован окислением добавляемых веществ ферментами лигнинолитического комплекса базидиомицетов (в частности, пероксидазами) с излучением квантов видимого света. В параллельных экспериментах *in vivo* показано, что добавки гиспидина (предшественника люциферина светящихся высших грибов) не влияют на интенсивность световой эмиссии мицелия. В то же время в исследованиях *in vitro* установлено, что кофейная кислота и обнаруженный низкомолекулярный стимулятор свечения не влияют на уровень светоизлучения выделенной из мицелия *N. nambi* ферментной люминесцентной системы в присутствии НАДФН и существенным образом подавляют реакцию излучения системы, активированной НАДФН и гиспидином. Совокупность полученных данных указывает на наличие в светящихся высших грибах разных биохимических путей генерации квантов видимого света с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, люминесцентная система, кофейная кислота, гиспидин, стимулятор свечения, механизм свечения грибов.

DOI: 10.31857/S0006302924030128, EDN: OEZVJJ

Светящиеся виды высших грибов распространены в разных регионах земного шара, особенно в субтропической и тропической зонах с наиболее благоприятными условиями их обитания [1–4]. Светящиеся базидиомицеты излучают зеленоватый свет с максимумом эмиссии 520–530 нм [5–7]. При этом у некоторых видов высших грибов наблюдается свечение всего плодового тела [8–10]; у иных видов может светиться только шляпка, или только ножка [11, 12], или только мицелий и ризоморфы [2, 6]. Известно, что светящиеся базидиомицеты являются грибами белой гнили, способными к деградации лигнина [6], и, как правило, являются сапрофитами (реже патогенами) растений [5].

За последние десять лет в изучении грибной биолюминесценции достигнуты заметные успехи [13–22]. Так, в настоящее время считается доказанным, что предшественником люциферина люминесцентной реакции базидиомицетов является их вторичный метаболит гиспидин [14]. В исследованиях с «холодными» и «горячими» экстрактами из разных видов светящихся грибов (*Neonothopanus nambi*, *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*, *Armillaria borealis*) авторы данной работы установили, что в присутствии O₂ и НАДФН гиспидин сначала преобразуется НАДФН-зависимой гидроксилазой в люциферин (3-гидрокси-гиспидин), который затем окисляется в присутствии кислорода нерастворимой люциферазой с излучением кванта видимого света. Позднее было

показано, что образующийся в реакции излучения оксилюциферин ферментативно гидролизует до кофейной кислоты, которая является предшественником биосинтеза гиспидина [18]. Надо сказать, что двухстадийный механизм грибной люциферин-люциферазной реакции, обеспечивающей биолюминесценцию *in vitro*, впервые был предложен в середине прошлого века на основании экспериментов с «холодными» и «горячими» экстрактами из светящихся базидиомицетов [23–25] и подтвержден в исследованиях в новом тысячелетии [26, 27].

В то же время, несмотря на успехи, достигнутые в изучении механизма грибной биолюминесценции, некоторые биохимические аспекты этого феномена не до конца понятны и требуют дальнейшего изучения. В частности, до сих пор остается неясным, какой фермент (или ферментный комплекс) выполняет в светящихся базидиомицетах функцию люциферазы, так как он не выделен в чистом виде и не охарактеризован. Не менее важные вопросы состоят в том, является ли люциферин-люциферазный механизм единственным механизмом грибного свечения, или генерация квантов видимого света в базидиомицетах осуществляется разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем) и является ли 3-гидроксигиспидин единственным субстратом грибной люминесцентной реакции.

Светоизлучающий базидиомицет *Neonothopanus nambi* является хорошо известным объектом в исследованиях механизмов биолюминесценции высших грибов. У гриба *N. nambi* наблюдается свечение всего плодового тела, мицелия и ризоморф. Из мицелия этого базидиомицета впервые был получен «холодный» экстракт, содержащий ферментную люминесцентную систему, которая обеспечивала свечение экстракта *in vitro* [13]. Позднее «холодные» экстракты, содержащие активные люминесцентные системы, были получены также из мицелия светящихся высших грибов *A. borealis* и *M. citricolor* [17].

Недавно в экстрактах из мицелия гриба *N. nambi* после его обработки β -глюкозидазой нами был обнаружен компонент, значительно увеличивающий уровень грибной биолюминесценции *in vivo* [22]. Было установлено, что стимулирующий свечение компонент является термостабильным низкомолекулярным соединением, обладающим флуоресценцией с максимумом эмиссии при 440 нм после возбуждения длинами волн 350–370 нм [22].

В предлагаемой работе нами представлены результаты сравнительных исследований *in vivo* и *in vitro* по влиянию кофейной кислоты, гиспидина и обнаруженного стимулятора на интенсивность свечения мицелия базидиомицета *N. nambi* и вы-

деленной из него ферментной люминесцентной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура базидиального гриба. В исследованиях использовали светящийся мицелий высшего гриба *Neonothopanus nambi* (штамм IBSO 2391) из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия).

Получение и подготовка пеллет мицелия для исследований. Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами светящегося мицелия *N. nambi*, которые получали при культивировании базидиомицета в погруженных условиях в жидкой питательной среде PDB (HiMedia Laboratory, Индия) изложенным нами ранее способом [28]. Выращенные пеллеты извлекали из питательной среды, многократно промывали деионизированной водой (Milli-Q system, Millipore, США), после чего инкубировали в деионизированной воде в течение 20–24 ч при медленном перемешивании со скоростью 60–80 об./мин (шейкер OS-10, Biosan, Латвия) для более полного удаления остатков питательной среды и метаболитов. Отмытые пеллеты мицелия использовали: для исследований *in vivo*; для получения разработанным нами способом [13] «холодных» экстрактов, содержащих ферментную люминесцентную систему; для получения предложенным нами методом [22] водных экстрактов, содержащих низкомолекулярный стимулятор грибного свечения *in vivo*.

Методы. «Холодные» экстракты, содержащие ферментную люминесцентную систему базидиомицета *N. nambi*, выделяли из биомассы мицелия при температуре 0–4°C. Пеллеты мицелия извлекали из деионизированной воды (см. выше) и механически разрушали протиранием через металлическое сито с диаметром пор 1 мм. Измельченную биомассу переносили в помещенный в ледяную баню стакан и добавляли охлажденный 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (Serva, Германия), в соотношении 1:5 (объем биомассы : объем буфера). Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Волна USTD-0.63/22 (U-Sonic, Россия). Ультразвуковую обработку проводили трижды по 10 с с интервалами 1 мин, после чего гомогенат центрифугировали при 40000 g в течение 30 мин при 4°C на центрифуге Avanti® J-E (Beckman-Coulter, США). Полученный супернатант («холодный» экстракт), содержащий ферменты и компоненты люминесцентной реакции, отбирали и использовали для исследований.

Водный экстракт, содержащий стимулятор свечения базидиомицета *N. nambi in vivo*, получа-

ли изложенным нами ранее способом [22]. Отмытые деионизированной водой пеллеты мицелия помещали в свежий объем деионизированной воды, содержащей β -глюкозидазу (Serva, Германия) в концентрации 0.5 МЕ/мл, и инкубировали при 25°C в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об./мин на шейкере OS-10. После инкубации жидкую часть (водный экстракт) отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр. Разделение высоко- и низкомолекулярных компонентов экстракта проводили ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 10 кДа (Merk Millipore, Германия). Для более полного отделения низкомолекулярных соединений от высокомолекулярных компонентов при ультрафильтрации экстракта в нем трижды заменяли деионизированную воду, каждый раз собирая подмембранные фильтраты. После диализа содержащие низкомолекулярные компоненты (в том числе стимулятор свечения) подмембранные фильтраты объединяли и концентрировали на роторном испарителе Rotavapor R-215 (Buchi, Швейцария). Полученный концентрат использовали в экспериментах.

Влияние изучаемых веществ (кофейной кислоты (Sigma, США), гиспидина (Sigma-Aldrich, США) и низкомолекулярного стимулятора) на грибное свечение оценивали в экспериментах *in vivo* (на пеллетах мицелия *N. nambi*) и *in vitro* (с использованием ферментной люминесцентной системы, выделенной из биомассы мицелия *N. nambi*). Для проверки функциональной активности ферментов выделенной люминесцентной системы использовали НАДФН (Sigma-Aldrich, США) и коммерческий гиспидин высокой степени чистоты (Sigma-Aldrich). Водный раствор гиспидина готовили *in situ* последовательными разведениями деионизированной водой исходного раствора гиспидина, приготовленного в метаноле (Sigma, США). Световую эмиссию содержащейся в образцах «холодного» экстракта ферментной люминесцентной системы активировали последовательными добавками приготовленных *in situ* водных растворов НАДФН и гиспидина. Образцы «холодных» экстрактов с высоким уровнем люминесцентной активности лиофильно высушивали (лиофильная сушилка ЛС-500, Россия) и хранили сухие препараты при температуре -30°C (морозильник MDF-U333, Sanyo Electric Co., Ltd., Япония) до момента использования. Было показано, что ферменты люминесцентных систем высших грибов проявляют высокую активность после хранения сухих «холодных» экстрактов в течение трех лет [17]. Для исследований высушенные препараты растворяли в деионизированной воде и использовали в экспериментах.

В исследованиях *in vivo* влияние изучаемых веществ на свечение пеллет мицелия *N. nambi* оценивали следующим образом. Индивидуальные

пеллеты (средний диаметр 5 мм) помещали в прозрачные пластиковые пробирки объемом 1.5 мл (Axygen Scientific, Inc., США), содержащие 300 мкл деионизированной воды. Пробирки устанавливали в измерительную камеру люминометра (GloMax[®] 20/20, Promega BioSystems Sunnyvale, Inc., США) и регистрировали исходный уровень свечения пеллет. После этого в образцы аккуратно (без перемешивания) вносили 5 мкл водных растворов изучаемых веществ (в использованных водных растворах реагентов концентрация кофейной кислоты составляла от 0.035 до 3.5 мМ, концентрация гиспидина – 33 мкМ) и вновь регистрировали интенсивность и динамику световой эмиссии пеллет.

В экспериментах *in vitro* эффекты изучаемых веществ на ферментную люминесцентную систему, выделенную из базидиомицета *N. nambi*, оценивали следующим образом. Прозрачные пробирки, содержащие 50 мкл препарата системы, устанавливали в люминометр GloMax[®] 20/20 и регистрировали начальный уровень световой эмиссии. Затем к препарату добавляли 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН, приготовленного *in situ* в деионизированной воде, и повторно регистрировали интенсивность и динамику свечения. Световые сигналы, регистрируемые после добавки НАДФН, с одной стороны, указывают на наличие в тестируемых препаратах люминесцентной системы гриба *N. nambi* эндогенного гиспидина, который утилизируется в ходе реакции светоизлучения, с другой – являются показателем функциональной активности ферментов люминесцентной системы. После снижения инициированного НАДФН светового сигнала до стационарного уровня к препарату системы добавляли 5 мкл водных растворов изучаемых веществ (кофейная кислота, обнаруженный стимулятор или гиспидин) для оценки их влияния на свечение выделенной люминесцентной системы. В другом случае, после добавки к препарату системы растворов НАДФН и гиспидина и выхода светового сигнала на максимальный уровень, к препарату добавляли 5 мкл раствора кофейной кислоты или обнаруженного стимулятора, оценивая эффект данных соединений по изменению интенсивности и динамики свечения. Во всех рассматриваемых выше случаях тестирования люминесценции интенсивность и динамику световых сигналов регистрировали на люминометре GloMax[®] 20/20 в режиме одно измерение в секунду и выражали уровень световой эмиссии в относительных единицах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология культивирования базидиомицета *N. nambi* в погруженных условиях при постоян-

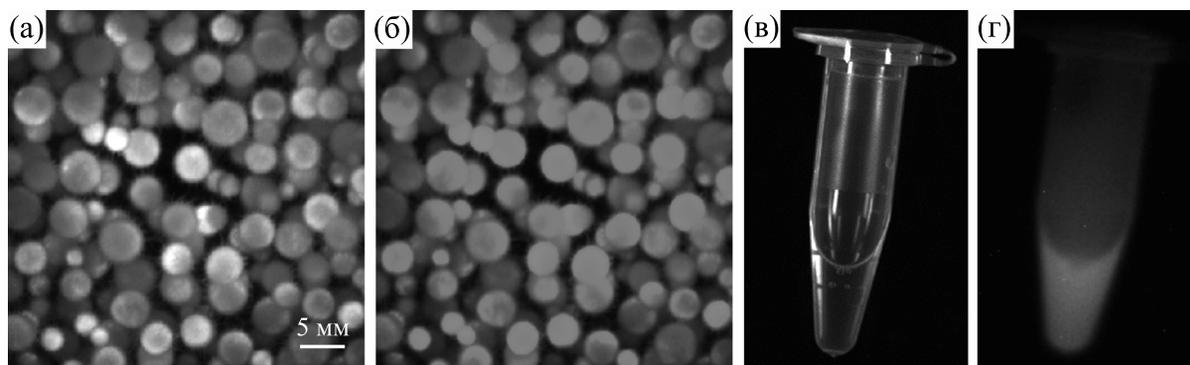


Рис. 1. Внешний вид и свечение пеллет мицелия базидиомицета *N. nambi* (а, б) и «холодного» экстракта, содержащего ферментную люминесцентную систему гриба, после добавления НАДФН, гиспидина и пероксида водорода (в, г). Изображения получены с помощью системы визуализации ChemiDocTM XRS. Масштаб – 5 мм.

ном орбитальном перемешивании питательной среды позволяет выращивать мицелий гриба в виде шарообразных пеллет диаметром от 2 до 7 мм [28] (рис. 1а,б). Поверхность пеллет имеет выраженную шероховатую поверхность, образованную большим количеством поверхностных гиф. Получаемый в виде небольших шарообразных пеллет мицелий имеет определенные преимущества для исследования: пеллеты легко переносить из одной жидкой среды в другую и легко помещать в отдельную пробирку шпателем; манипуляции с пеллетами осуществляются при минимальном механическом воздействии на гриб, не нарушая его целостности. «Холодные» экстракты, содержащие компоненты люминесцентной реакции, получали с помощью механического разрушения биомассы мицелия и последующей обработки гомогенатов ультразвуком. На рис. 1в показан внешний вид осветленного с помощью центрифугирования «холодного» экстракта, который обладает регистрируемым свечением, уровень которого ожидаемо возрастает после добавления НАДФН и гиспидина. Следует сказать, что ранее нами был выявлен эффект повышения уровня световой эмиссии мицелия и выделенной из него ферментной люминесцентной системы при добавках пероксида водорода [29, 30]. Это позволило нам высказать в данных работах идею, что в механизм светоизлучения высших грибов могут вовлекаться ферментные системы (оксидазные ферменты лигнинолитического комплекса и система цитохрома P450), которые могут генерировать активные формы кислорода и с их участием катализировать окисление органических соединений с излучением квантов видимого света. Позднее в экспериментах *in vitro* мы установили, что при добавлении к «холодному» экстракту НАДФН, гиспидина и H_2O_2 уровень его световой эмиссии может быть столь значительным, что наблюдается в темноте визуально и регистрируется системой визуализации Chemi-

DocTM XRS (Bio-Rad, США) при работе в темновом режиме (рис. 1г).

В недавней работе [22] мы сообщали, что при выделении внеклеточных ферментов с помощью обработки пеллет мицелия *N. nambi* β -глюкозидазой в полученных водных экстрактах был обнаружен низкомолекулярный компонент, многократно увеличивающий интенсивность свечения гриба *in vivo*. Установление ряда свойств данного компонента и оценка его молекулярной массы с помощью гель-фильтрационной хроматографии позволили сделать вывод, что обнаруженный стимулятор свечения не является субстратом (или его предшественником) ферментной люминесцентной системы гриба *N. nambi* и не может являться кофейной кислотой. Выполненные в настоящей работе исследования с указанными соединениями выявили различия в их эффектах на биолюминесценцию светящегося базидиомицета *N. nambi in vivo* и *in vitro*.

В экспериментах *in vivo* было установлено, что обнаруженный стимулирующий свечение компонент при добавках к светящемуся мицелию *N. nambi* повышает уровень его световой эмиссии до полутора порядков и более (рис. 2а). Аналогичный эффект в экспериментах *in vivo* был получен также при использовании кофейной кислоты — при ее добавках к светящемуся мицелию *N. nambi* наблюдалось быстрое и значительное (на порядок и более) увеличение интенсивности световой эмиссии (рис. 2б). Как видно из представленных данных (рис. 2а,б), в обоих случаях повышение интенсивности светоизлучения пеллет регистрируется уже в течение первой минуты после добавления изучаемых соединений. В исследованиях было установлено, что увеличивающие свечение эффекты стимулятора и кофейной кислоты являются дозозависимыми и нарастают с увеличением количества добавляемых к пеллетам веществ. Это следует из анализа максимального уровня свечения пеллет при добавках разных количеств

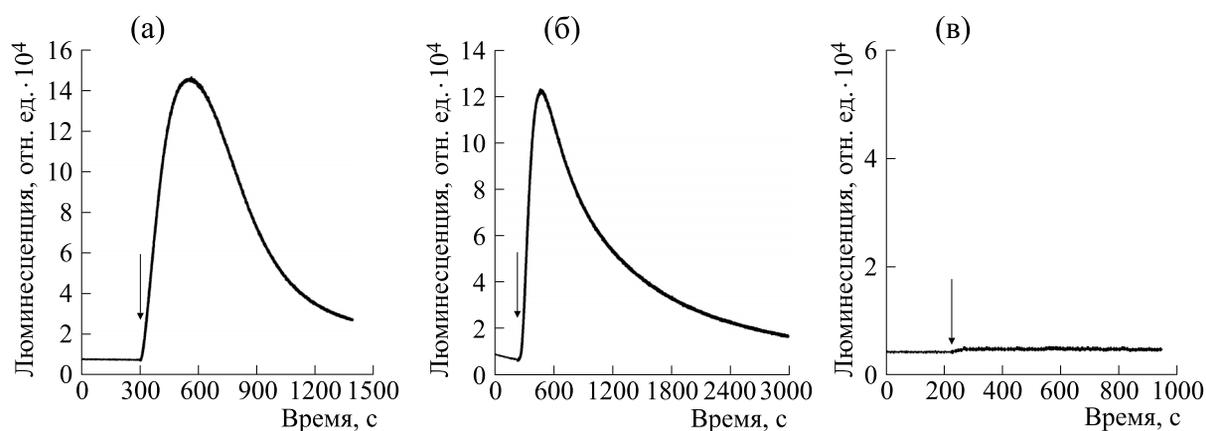


Рис. 2. Интенсивность и динамика люминесцентных сигналов, регистрируемых при добавках к пеллетам мицелия *N. nambí* водных растворов изучаемых соединений: (а) – низкомолекулярный стимулятор грибного свечения, (б) – кофейная кислота, (в) – гиспидин. Стрелками показаны моменты добавления реагентов к образцам пеллет.

данных веществ и площадей под кривыми регистрируемых при этом люминесцентных сигналов, отражающих суммарный квантовый выход. В то же время, в сравнительных экспериментах *in vivo* было показано, что добавки к пеллетам мицелия *N. nambí* водного раствора гиспидина не вызывали сколько-нибудь заметных изменений в уровнях их световой эмиссии (рис. 2в). По крайней мере, не было зарегистрировано каких-либо изменений в интенсивности свечения пеллет при добавках к образцам 5 мкл гиспидина с концентрацией 33 мкМ. При этом следует заметить, что гиспидин образуется в высших грибах из кофейной кислоты под действием гиспидин-синтазы и, являясь прекурсором люциферина, участвует в светоизлучении базидиомицетов, катализируемом ферментной системой «НАДФН-зависимая гидроксилаза – люцифераза» [18].

Представленные выше результаты сравнительных исследований *in vivo* (рис. 2а–в) позволили нам сделать следующие выводы. Отсутствие стимулирующего свечение эффекта гиспидина может свидетельствовать в пользу того, что на поверхности клеточной стенки базидиомицета *N. nambí* (или в структурных элементах клеточной стенки) отсутствуют ферменты, участвующие в трансформации гиспидина в люциферин и его окислении с излучением света. В то же время стимуляция грибного свечения кофейной кислотой и обнаруженным стимулятором позволяет нам высказать требующую дальнейшего изучения гипотезу, что генерация квантов видимого света в светоизлучающих высших грибах обеспечивается разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов. Исходя из этого, мы предполагаем, что стимулирующее действие кофейной кислоты и обнаруженного стимулятора связано с наличием в грибе *N. nambí* иного биохимического

механизма светоизлучения. Такой механизм может обеспечиваться функционированием внеклеточных грибных оксидаз (прежде всего, оксидаз лигнинолитического комплекса), катализирующих окисление кофейной кислоты и стимулятора с излучением квантов видимого света. В пользу этого свидетельствует быстрая (в пределах одной минуты) кинетика развития люминесцентных сигналов, наблюдаемая при добавках стимулирующего компонента и кофейной кислоты к пеллетам мицелия *N. nambí*, которые могут взаимодействовать с внеклеточными грибными оксидазами, находящимися в поверхностных структурах клеточной стенки гриба. В дополнение следует отметить также, что полученные в исследованиях *in vivo* данные о стимуляции световой эмиссии мицелия *N. nambí* кофейной кислотой (рис. 2б) согласуются с результатами активации свечения живых пластинок шляпки гриба *M. chlorophos* этим веществом [31, 32]. Это позволяет нам с большой долей уверенности предполагать, что стимулирующий свечение *in vivo* эффект кофейной кислоты является общим для всех видов базидиальных грибов, обладающих биолюминесценцией.

В исследованиях *in vitro* с содержащими ферментную люминесцентную систему базидиомицета *N. nambí* «холодными» экстрактами нами были выявлены абсолютно противоположные эффекты изучаемых веществ на свечение по сравнению с эффектами, которые наблюдались в экспериментах *in vivo* с пеллетами грибного мицелия. Было установлено, что кофейная кислота и обнаруженный стимулятор свечения не вызывают увеличения интенсивности световой эмиссии «холодного» экстракта с предварительно добавленным в него НАДФН (рис. 3а,б). В то же время добавка гиспидина (как предшественника грибного люциферина) к содержащему НАДФН «хо-

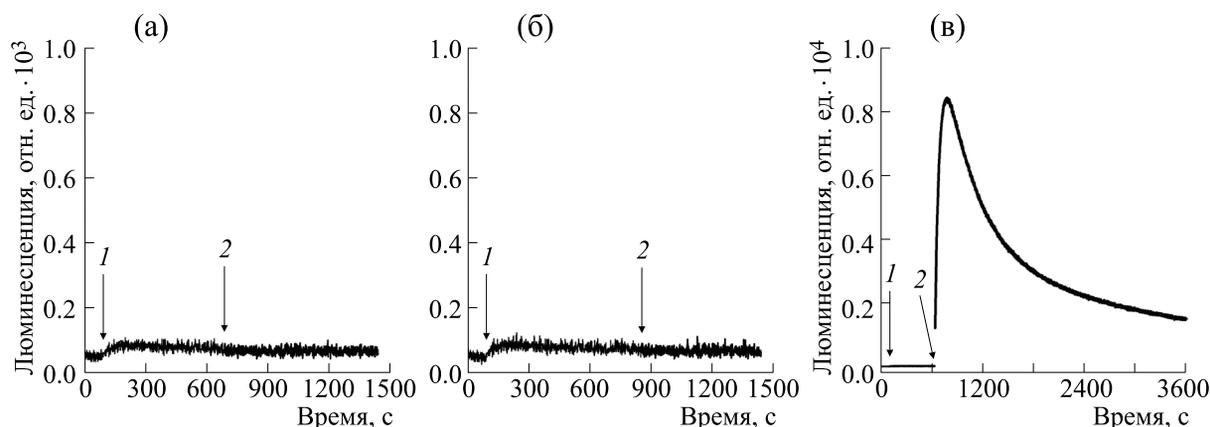


Рис. 3. Интенсивность и динамика люминесцентных сигналов, регистрируемых при добавках к образцам «холодного» экстракта, содержащего ферментную люминесцентную систему гриба *N. nambi*, водных растворов изучаемых соединений: (а) – низкомолекулярный стимулятор грибного свечения, (б) – кофейная кислота, (в) – гиспидин. Стрелками показаны моменты добавления НАДФН (1) и изучаемого реагента (2) в экстракт.

лодному» экстракту ожидаемо приводила к развитию люминесцентного сигнала (рис. 3в). При этом в экспериментах *in vitro* было обнаружено, что добавки кофейной кислоты (или стимулирующего компонента) существенным образом подавляют интенсивность световых сигналов люминесцентной системы, активированной НАДФН и гиспидином (рис. 4). Было показано также, что ингибирующий свечение эффект является дозозависимым и нарастает от количества веществ, вносимых в пробу. Мы полагаем, что наблюдаемое ингибирование кофейной кислотой светоизлучающей реакции грибной люминес-

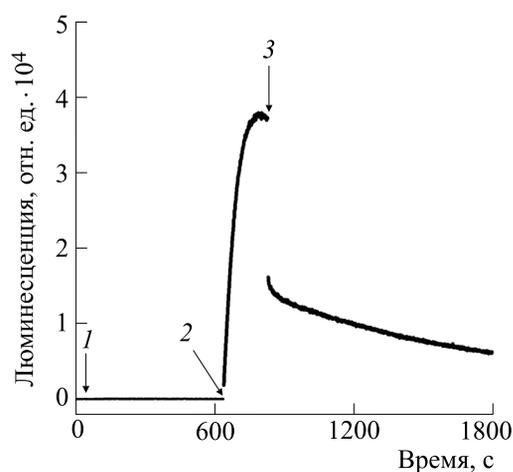


Рис. 4. Типичный эффект ингибирования кофейной кислотой (и низкомолекулярным стимулятором свечения) светового сигнала, генерируемого ферментной люминесцентной системой гриба *N. nambi*, активированной НАДФН и гиспидином. Стрелками показаны моменты добавления ингредиентов: 1 – НАДФН, 2 – гиспидин, 3 – кофейная кислота (или стимулятор).

центной системы может объясняться с точки зрения классической биохимии, поскольку согласуется с понятием об ингибировании фермента продуктом реакции по принципу обратной отрицательной связи. В нашем случае, такой механизм действия кофейной кислотой представляется вполне правомочным, поскольку она является конечным продуктом трансформации гиспидина в светоизлучении высших грибов [18].

С одной стороны, полученные в исследованиях *in vitro* результаты (рис. 3а–в) позволяют говорить, что в использованных нами экспериментальных условиях кофейная кислота не трансформируется в гиспидин под действием находящихся в «холодном» экстракте ферментов, а обнаруженный стимулирующий свечение компонент не является субстратом (или его предшественником) для выделенной люминесцентной системы. В то же время эти данные свидетельствуют в пользу высказанной нами выше гипотезы о разных биохимических механизмах генерации квантов видимого света в светоизлучающих базидиомицетах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований развивают и дополняют представления о механизмах светоизлучения высших грибов. Совокупность полученных данных указывает на наличие разных биохимических путей генерации квантов видимого света в обладающих биолюминесценцией базидиомицетах с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов. В свою очередь, это позволяет рассматривать регистрируемое (и визуально наблюдаемое) свечение высших грибов как интегральный показатель функционирования разных ферментных систем:

в частности, системы «НАДФН-зависимая гидроксиллаза — люцифераза» с участием гиспидина и оксидазных ферментов лигнинолитического комплекса с участием кофейной кислоты и обнаруженного стимулятора грибного свечения *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2024-0018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chew A. L., Desjardin D. E., Tan Y. S., Musa M. Y., and Sabaratnam V. Bioluminescent fungi from Peninsular Malaysia – a taxonomic and phylogenetic overview. *Fungal Divers.*, **70**, 149–187 (2014). DOI: 10.1007/s13225-014-0302-9
- Mihail J. D. Bioluminescence patterns among North American *Armillaria* species. *Fungal Biol.*, **119**, 528–537 (2015). DOI: 10.1016/j.funbio.2015.02.004
- Desjardin D. E., Perry B. A., and Stevani C. V. New luminescent mycenoid fungi (Basidiomycota, Agaricales) from São Paulo State, Brazil. *Mycologia*, **108**, 1165–1174 (2016). DOI: 10.3852/16-077
- Oba Y. and Hosaka K. The luminous fungi of Japan. *Journal of Fungi*, **9** (6), 615 (2023). DOI: 10.3390/jof9060615
- Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2006).
- Desjardin D. E., Oliveira A. G., and Stevani C. V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 170–182 (2008). DOI: 10.1039/B713328F
- Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Y. N., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Puzyr A. P., Burov A. A., Bondar V. S., and Gitelson J. I. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, **29** (7), 703–710 (2014). DOI: 10.1002/bio.2656
- Brandl H. Luminescent wood in coal and ore mines – A historical review. *Fungi Magazine*, **4** (2), 5–9 (2011). DOI: 10.5167/uzh-53631
- Vydryakova G. A., Van D. T., Shoukouhi P., Psurtseva N. V., and Bissett J. Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in *Neonothopanus nambi* (Agaricales) from Vietnam. *Mycology*, **3**, 89–99 (2012). DOI: 10.1080/21501203.2011.637085
- Oliveira A. G., Stevani C. V., Waldenmaier H. E., Viviani V., Emerson J. M., Loros J. J., and Dunlap J. C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. *Curr. Biol.*, **25** (7), 964–968 (2015). DOI: 10.1016/j.cub.2015.02.021
- Desjardin D. E., Capelari M., and Stevani C. V. Bioluminescent *Mycena* species from São Paulo, Brazil. *Mycologia*, **99** (2), 317–331 (2007). DOI: 10.3852/mycologia.99.2.317
- Teranishi K. Localization of the bioluminescence system in the pileus of *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **31** (2), 594–599 (2016). DOI: 10.1002/bio.3001
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Petunin A. I., Burov A. E., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Shpak B. A., Tyaglik A. B., Shimomura O., and Gitelson J. I. Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **455** (1), 56–58 (2014). DOI: 10.1134/S1607672914020045
- Purtov K. V., Petushkov V. N., Baranov M. S., Mineev K. S., Rodionova N. S., Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Petunin A. I., Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A. S., Lukyanov S., Gitelson J. I., and Yampolsky I. V. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **54** (28), 8124–8128 (2015). DOI: 10.1002/anie.201501779
- Oba Y., Suzuki Y., Martins G. N. R., Carvalho R. P., Pereira T. A., Waldenmaier H. E., Kanie S., Naito M., Oliveira A. G., Dörr F. A., Pinto E., Yampolsky I. V., and Stevani C. V. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16** (9), 1435–1440 (2017). DOI: 10.1039/c7pp00216e
- Kaskova Z. M., Dörr F. A., Petushkov V. N., Purtov K. V., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Mineev K. S., Guglya E. B., Kotlobay A., Baleeva N. S., Baranov M. S., Arseniev A. S., Gitelson J. I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H. E., Pereira T. A., Carvalho R. P., Oliveira A. G., Oba Y., Bastos E. L., Stevani C. V., and Yampolsky I. V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci. Adv.*, **3** (4), e1602847 (2017). DOI: 10.1126/sciadv.1602847
- Puzyr A. P., Medvedeva S. E., Artemenko K. S., and Bondar V. S. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage. *Curr. Res. Env. Appl. Mycol.*, **7** (3), 227–235 (2017). DOI: 10.5943/cream/7/3/9
- Kotlobay A. A., Sarkisyan K. S., Mokrushina Y. A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E. O., Markina N. M., Gonzalez Somermeyer L., Gorokhovatsky A. Y., Vvedensky A., Purtov K. V., Petushkov V. N., Rodionova N. S., Chepumykh T. V., Fakhranurova L. I., Guglya E. B., Ziganshin R., Tsarkova A. S., Kaskova Z. M., Shender V., Abauov M., Abakumova T. O., Povolotskaya I. S., Eroshkin F. M., Zarskiy A. G., Mishin A. S., Dolgov S. V., Mitouchkina T. Y., Kopantzev E. P., Waldenmaier H. E., Oliveira A. G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E. A., Gabaldón T., Stevani C. V., Lukyanov S., Smirnov I. V., Gitelson J. I., Kondrashov F. A., and Yampolsky I. V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115** (50), 12728–12732 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1803615115

19. Teranishi K. Bioluminescence and chemiluminescence abilities of trans-3-hydroxyhispidin on the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **33** (7), 1235–1242 (2018). DOI: 10.1002/bio.3540
20. Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Burova O. G., and Bondar V. S. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, **10** (2), 84–91 (2019). DOI: 10.1080/21501203.2019.1583688
21. Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., and Navizet I. Fungal Light Emitter: Understanding Its Chemical Nature and pH-Dependent Emission in Water Solution. *J. Org. Chem.*, **85** (8), 5503–5510 (2020). DOI: 10.1021/acs.joc.0c00246
22. Ronzhin N. O., Posokhina E. D., Mogilnaya O. A., and Bondar V. S. Finding the Light Emission Stimulator of *Neonothopanus nambi* Basidiomycete and Studying Its Properties. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **503**, 80–84 (2022). DOI: 10.1134/S1607672922020120
23. Airth R. L. and McElroy W. D. Light emission from extracts of luminous fungi. *J. Bacteriol.*, **77**, 249–250 (1959). DOI: 10.1128/jb.77.2.249-250.1959
24. Airth R. L. and Foerster G. E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 567–573 (1962). DOI: 10.1016/0003-9861(62)90124-8
25. Airth R. L. and Foerster G. E. Enzymes Associated with the Bioluminescence of *Panus stipticus* luminescens and *Panus stipticus* non-luminescens. *J. Bacteriol.*, **88**, 1372–1379 (1964). DOI: 10.1128/jb.88.5.1372-1379.1964
26. Oliveira A. G. and Stevani C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 1416–1421 (2009). DOI: 10.1039/B908982A
27. Oliveira A. G., Desjardin D. E., Perry B. A., and Stevani C. V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11** (5), 848–852 (2012). DOI: 10.1039/c2pp25032b
28. Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., and Bondar V. S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with β -glucosidase. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, **8** (1), 75–85 (2018). DOI: 10.5943/cream/8/1/6
29. Bondar V. S., Shimomura O., and Gitelson J. I. Luminescence of Higher Mushrooms. *J. Sib. Fed. Univ. Biology*, **5** (4), 331–351 (2012). DOI: 10.17516/1997-1389-0127
30. Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Tyulkova N. A., Tyaglik A. B., Shpak B. A., and Gitelson J. I. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **449**, 80–83 (2013). DOI: 10.1134/S1607672913020075
31. Teranishi K. Second bioluminescence-activating component in the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **32** (2), 182–189 (2017). DOI: 10.1002/bio.3165
32. Teranishi K. A combination of NADHP and hispidin is not essential for bioluminescence in luminous fungal living gills of *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **32** (5), 866–872 (2017). DOI: 10.1002/bio.3265

Effects of Caffeic Acid, Hispidin and the Discovered Stimulating Component on Luminescence of Mycelium and a Luminescent System of Basidiomycete *Neonothopanus nambi*

N.O. Ronzhin*, E.D. Posokhina*, V.M. Le**, O.A. Mogilnaya*, Yu.V. Zakharova***, A.S. Sukhikh**, and V.S. Bondar*

*Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

**Kemerovo State University, Krasnaya ul. 6, Kemerovo, 650000 Russia

***Kemerovo State Medical University, ul. Voroshilova 22a, Kemerovo, 650056 Russia

In vivo studies have revealed that the addition of caffeic acid and a low-molecular-weight compound, a bioluminescence stimulator, discovered in our research, to the mycelium of the luminous fungus *Neonothopanus nambi* leads to a rapid and significant (by an order of magnitude or more) increase in the intensity of its light emission. It has been suggested that the observed effect of activation of fungal bioluminescence may be mediated by the oxidation of added substances by enzymes of the ligninolytic complex of basidiomycetes (in particular, peroxidases) with the emission of visible light quanta. Parallel *in vivo* experiments showed that additions of hispidin (a luciferin precursor in the luminous higher fungi) have no effect on the light emission intensity of the mycelium. At the same time, *in vitro* studies have reported that caffeic acid and the detected low-molecular luminescence stimulator do not affect the level of light emission of the enzyme luminescent system isolated from the *N. nambi* mycelium in the presence of NADPH and significantly suppress the emission reaction of the system activated by NADPH and hispidin. A set of data collected demonstrate that different biochemical pathways present in the luminous higher fungi and different enzymes (or enzyme systems) and different substrates are involved in generation of visible light quanta.

Keywords: luminous higher fungi, luminescent system, caffeic acid, hispidin, light emission stimulator, mechanism of fungal luminescence

УДК 577.332.23

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКА *L. mingrelica* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНТАМИЦИНА НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ *E. coli*

© 2024 г. Г.Ю. Ломакина*, #, С.С. Каминская*, **, Н.Н. Угарова*

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

**Факультет фундаментальных наук Московского государственного технического университета имени Н.Э. Баумана, 2-ая Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия

#E-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Поступила в редакцию 29.02.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Продемонстрированы возможности использования тест-системы на основе живых клеток *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующих рН-резистентную термостабильную люциферазу светляка *Luciola mingrelica* для изучения кинетики действия аминогликозидов (на примере гентамицина) по изменению содержания АТФ и люциферазы внутри и вне клеток. Показано, что через 3 ч инкубации бактерий с антибиотиком становится возможным оценить изменение жизнеспособности клеток, эффективность действия антибиотика и прогнозировать образование персистеров. Метод перспективен при проведении быстрого первичного высокопроизводительного скрининга антибактериальных агентов и лекарственных форм для оценки их эффективности и механизма их действия.

Ключевые слова: люцифераза светляков, биолюминесценция, аминогликозиды, гентамицин, *E. coli*.

DOI: 10.31857/S0006302924030138, EDN: OEYVCA

Биолюминесцентная люциферин-люциферазная реакция окисления D-люциферина кислородом в присутствии АТФ и ионов магния, катализируемая люциферазой светляков, предоставляет широкие возможности ее использования в биоаналитической химии, не только для определения ультрамалых количеств АТФ [1], но и люциферазы [2, 3].

Биолюминесцентные тест-системы на основе живых прокариотических и эукариотических клеток, продуцирующих мутантную термостабильную люциферазу светляков *L. mingrelica*, перспективны для изучения влияния и быстрой оценки эффективности действия лекарственных средств и изучения функционирования организмов при физиологических условиях в условиях клеточного стресса различной природы, позволяют параллельно изучать кинетику изменения двух биолюминесцентных маркеров – АТФ и люциферазы – внутри и вне клеток [4]. Примеры использования тест-системы для мониторинга клеточного гомеостаза под воздействием внешних стимулов физической и химической природы на

живые клетки (прокариоты и эукариоты) приведены в работе [5]. Это удобная, быстрая и надежная модель для изучения эффективности и механизма действия антибактериальных агентов разных классов, поскольку большинство традиционных антибиотиков разрушают АТФ-зависимые мишени. Изучение кинетики изменения концентрации АТФ и люциферазы позволяет определять жизнеспособность, метаболическую активность, цитотоксичность, выживаемость клеток в условиях клеточного стресса, оценивать эффективность литических агентов по изменению проницаемости клеточной мембраны, наблюдать за процессами синтеза/гидролиза АТФ, выявлять стадии образования персистеров и формирования толерантности к антибиотикам. Ранее мы показали возможность использования тест-системы для изучения механизма действия мембрано-активного полипептидного поликатиона колистина [6] и продемонстрировали, что полимиксин вызывает резкое истощение внутриклеточного АТФ за счет остановки его синтеза и

утилизации внутри клетки, что приводит к ее быстрой гибели [4].

Аминогликозидные антибиотики широко используются для лечения многих грамотрицательных и некоторых грамположительных инфекций, а также туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью из-за их высокой эффективности и низкой стоимости. Аминогликозиды состоят из 2-дезоксистрептаминового кольца, к которому присоединены два или более аминомодифицированных сахаров через гликозидные связи. Их мощная бактерицидная активность основана на специфическом связывании с 16S рРНК 30S рибосомальной субъединицы, препятствующем синтезу белка [7]. Проникновение аминогликозидов в цитоплазму происходит в три этапа [8, 9]. На первой энергозависимой стадии (first energy-dependent phase – EDP-1) поликатионные антибиотики в результате ионных взаимодействий быстро связываются с анионными компонентами клеточной поверхности (липополисахариды, фосфолипиды и белки внешней мембраны) грамотрицательных бактерий, в результате чего происходит вытеснение двухвалентных катионов, образующих поперечные мостики с соседними молекулами липополисахарида. Это приводит к увеличению проницаемости мембраны и проникновению молекул аминогликозида в периплазматическое пространство [10] и затем в цитоплазму посредством механизмов, зависящих от протондвижущей силы, вызывая ошибки в синтезе белка. Данная стадия требует активно функционирующей системы переноса электронов, поэтому анаэробные бактерии, как правило, нечувствительны к этим антибиотикам [11]. Неправильно транслируемые мембранные белки вызывают нарушение целостности цитоплазматической мембраны, вызывая следующий этап, известный как «энергозависимая фаза II» (second energy-dependent phase – EDP-2), что приводит к поглощению большего количества аминогликозида и в конечном итоге к гибели клетки [12]. Вторая энергозависимая фаза (EDP-2) протекает быстрее, чем первая (EDP-1), и требует связывания с рибосомами. Наступление этой фазы соответствует началу ингибирования синтеза белка и потере жизнеспособности клеток. Во время первой фазы поглощения особенно важна протондвижущая сила [13], величина которой определяется эффективностью функционирования дыхательных комплексов – чем выше их активность, тем выше уровень протондвижущей силы, тогда как вторая фаза возникает в ответ на дефектную трансляцию. При снижении энергетического выхода используемой дыхательной цепи наблюдается увеличение степени выживаемости микроорганизмов в присутствии антибиотика [14] и образование персистеров.

Можно ожидать, что изучение кинетики изменения низкомолекулярного маркера АТФ и высокомолекулярной люциферазы позволит оценить процессы, протекающие во времени при действии аминогликозидов на клетки *E. coli*, такие как скорость гибели клетки, влияние на синтез белка и функционирование рибосом, изменение проницаемости клеточной мембраны, способность к образованию персистеров, а также быстро определить минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика.

Целью данной работы является изучение кинетики изменения содержания АТФ и люциферазы внутри и вне клеток *E. coli* в присутствии различных концентраций гентамицина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельной культуры использовали штамм *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus (Novagen, США), продуцирующий рН-резистентную термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelica*. Ночную культуру получали в 3 мл лизогенной среды Luria-Bertani (LB) при 37°C и 230 об/мин в течение 17–18 ч в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия); A_{590} составляла 1.5 ± 0.1 . Суспензию клеток разбавляли свежей средой LB до нужной концентрации. 100 мкл раствора гентамицина сульфата в 0.9% физиологическом растворе или физиологический раствор (контроль) добавляли к 800 мкл суспензии клеток. Конечная концентрация гентамицина в реакционной смеси составляла 0.011–71 мкг/мл. Образцы инкубировали в аэрированных условиях при 37°C с орбитальным встряхиванием при 230 об/мин в течение 4 ч в 24-луночных планшетах. В процессе инкубации отбирали пробы для измерения содержания АТФ и активности люциферазы внутри и вне клеток [4].

Через 4 ч инкубации с антибиотиком клеточную культуру центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 мин, отделяли супернатант, содержащий антибиотик, а осадок ресуспендировали в 800 мкл свежей питательной среды LB. Полученную клеточную суспензию инкубировали при перемешивании (18 ч, 37°C, 230 об/мин). Для определения КОЕ методом посевов разведений на агаризованной LB среде (5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона и 10 г/л NaCl, 11 г/л агара) отбирали пробы до добавления антибиотика, сразу после удаления антибиотика и через 18 ч инкубации в среде LB, инкубировали 20 ч при 37°C и подсчитывали образовавшиеся колонии.

Для анализа АТФ использовали АТФ-реагент на основе термостабильной люциферазы светляка *Luciola mingrelica* (ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия) и определяли содержание АТФ вне клеток (ATP_{ex}) и общее содержание АТФ

(ATP_{tot}), как описано в [4]. Для этого к 20 мкл образца клеток (для определения ATP_{ex}) или клеточного экстракта, полученного обработкой свежеперегнанным 100%-ным диметилсульфоксидом в соотношении 1:9 (v/v) (для определения ATP_{tot}), добавляли 100 мкл АТФ-реагента и регистрировали интенсивность свечения в течение 30 с на люминометре FB-12 (Zulux Corp., Германия), используя фильтр с пропусканием 1.25%. Содержание АТФ внутри клеток (ATP_{in}) рассчитывали по разности $ATP_{in} = ATP_{tot} - ATP_{ex}$. Для измерения активности люциферазы вне клеток (Luc_{ex}) использовали субстратную смесь с pH 7.8, содержащую 4 мМ АТФ, 0.3 мМ D-люциферина, 20 мМ Mg^{2+} , буферные соли и др. компоненты и регистрировали интенсивность свечения в течение 30 с. Для измерения активности люциферазы внутри клеток (Luc_{in}) использовали субстратную смесь, содержащую 2 мМ D-люциферина, 20 мМ Mg^{2+} с pH 5.0 и регистрировали интенсивность свечения в течение 60–80 с. Измерения проводили в микрокуветах вместимостью 240 мкл после добавления 100 мкл соответствующей субстратной смеси к 20 мкл неразбавленной клеточной суспензии.

Представлены средние значения трех независимых экспериментов. Статистический анализ проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистическая значимость была определена как $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали клетки *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующие мутантную нечувствительную к изменению pH термостабильную люциферазу светляков *L. mingrelica* [15, 16], которая позволяет инкубировать клетки при 37°C без инактивации внутриклеточного фермента. Кроме того, продуцируемая люцифераза нечувствительна к эффекту снижения внутриклеточного pH в процессе экспоненциального роста клеток *E. coli* [17]. Для определения активности люциферазы внутри клеток (Luc_{in}) мы использовали субстратную смесь при pH 5.0, при котором люциферин теряет отрицательный заряд и способен проникать внутрь клетки. Поступающий люциферин инициирует свечение, пропорциональное концентрации эндогенной люциферазы Luc_{in} благодаря тому, что в клетке существуют оптимальные условия для протекания биoluminesцентной реакции (pH ~7.6, насыщающие концентрации АТФ и ионов Mg^{2+}). При pH 5.0 внеклеточная люцифераза мгновенно инактивируется, наблюдаемая активность относится только к Luc_{in} . Для измерения активности Luc_{ex} мы ис-

пользовали субстратную смесь с pH 7.8, содержащую насыщающие концентрации субстратов. При этом значении pH проницаемость клеточной мембраны не меняется – отрицательный мембранный потенциал клеточной мембраны не позволяет отрицательно заряженному люциферину проникать в клетку, и наблюдаемый биoluminesцентный сигнал соответствует активности только внеклеточной люциферазы Luc_{ex} . В отдельном эксперименте было показано, что гентамицин не влияет на активность люциферазы.

Кинетика изменения ATP_{in} и ATP_{ex} . Влияние гентамицина на растущие клетки *E. coli*, продуцирующие люциферазу, изучали при начальных концентрациях клеток в 25, 131 и 233 млн КОЕ/мл в аэрированных условиях при 37°C в среде LB при орбитальном перемешивании, концентрацию антибиотика варьировали в диапазоне 0.01–0.07 мкг/мл.

Изучение кинетики изменения внутриклеточного ATP_{in} показало, что в присутствии низких концентраций антибиотика (0.1–0.6 мкг/мл реакционной смеси, см. рис. 1, кривые 4 и 5) кривые роста клеток сопоставимы с контрольным экспериментом и через 4 ч инкубации концентрация ATP_{in} в этих образцах возросла в 12 раз.

При высоких концентрациях гентамицина (14–71 мкг/мл, кривые 1 и 2 на рис. 1) рост клеток отсутствовал – через 3.5 ч уровень ATP_{in} снизился на 10% ниже исходного и вышел на постоянное значение, что свидетельствует о снижении метаболической активности и жизнеспособности клеток и проявлении преимущественно бактерицидного действия гентамицина.

При концентрации гентамицина 2.8 мкг/мл (кривая 3) максимальное значение ATP_{in} наблюдалось через 2 ч, клетки продолжали расти, хотя скорость деления клеток была в 1.7–4.0 раза ниже по сравнению с контролем, причем чем выше была исходная концентрация клеток, тем большее количество клеток сохранили способность к делению. Таким образом, эффективность действия гентамицина зависела от исходной концентрации клеток и, соответственно, от удельного содержания антибиотика в расчете на одну клетку. При исходной концентрации клеток 25 млн КОЕ/мл для этой концентрации антибиотика его удельное содержание в расчете на 1 клетку *E. coli* составляет 0.11 пг/КОЕ, уровень ATP_{in} практически не менялся и наблюдался бактериостатический эффект. При концентрациях клеточной суспензии 131 и 233 млн КОЕ/мл удельное содержание антибиотика уменьшилось до значений соответственно 0.02 и 0.01 пг/КОЕ и его эффективность снизилась – на начальном этапе наблюдался рост ATP_{in} , клетки еще продолжали функционировать и делиться, далее уровень АТФ снижался и

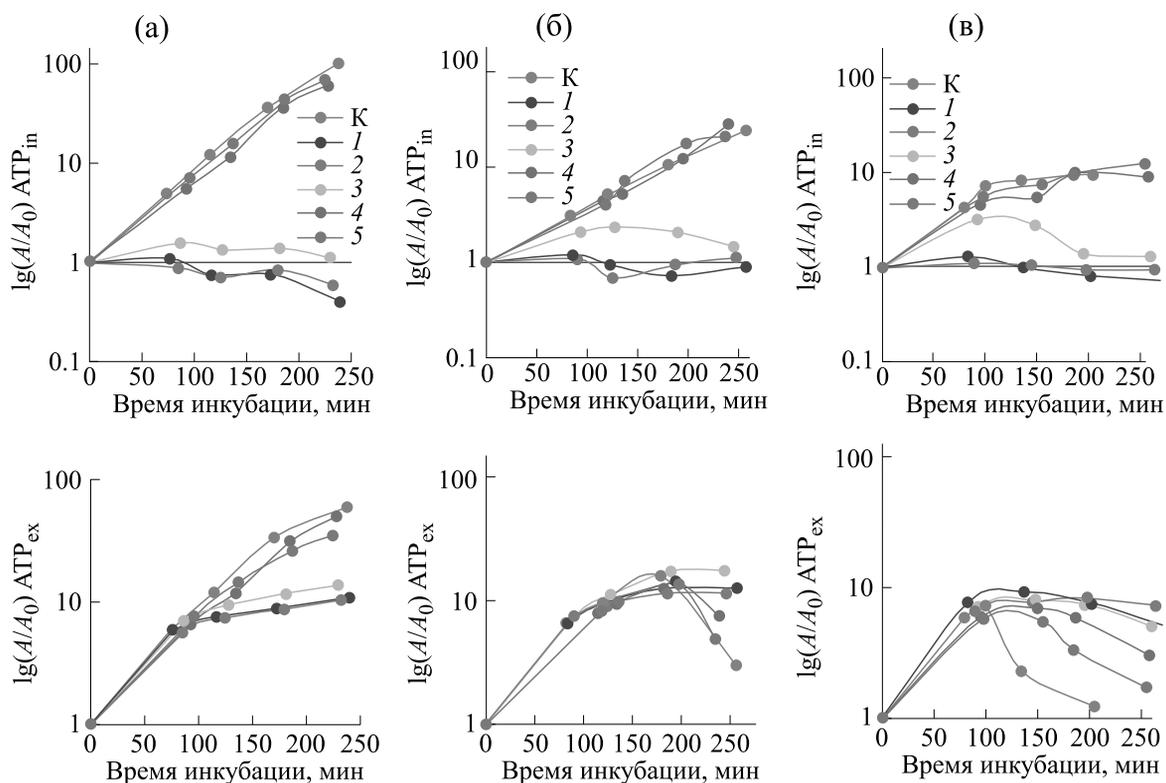


Рис. 1. Кинетика изменения концентрации ATP_{in} (верхний ряд графиков) и ATP_{ex} (нижний ряд графиков) в процессе инкубации клеток *E. coli* в присутствии гентамицина в полулогарифмических координатах. Исходная концентрация клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Концентрации гентамицина, мкг/мл: кривая 1 – 71, кривая 2 – 14, кривая 3 – 2,8, кривая 4 – 0,6, кривая 5 – 0,1, кривая «К» – 0. Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

через 4 ч инкубации выходил на постоянное значение – значительная часть клеток сохранила жизнеспособность.

Уровень внеклеточного ATP_{ex} является более сложным для анализа индикатором – он характеризует протекание двух параллельных процессов – накопление внеклеточного ATP_{ex} как за счет изменения проницаемости клеточной мембраны под действием литического агента, так и в результате деления клеток, в процессе которого может происходить механическая утечка ATP при делении клетки на две дочерние. В отсутствие гентамицина в контрольном образце наличие линейных участков $\lg A/A_0(t)$ для ATP_{ex} и ATP_{in} протяженностью не менее 100 мин, независимо от исходной концентрации клеток, свидетельствует о протекании экспоненциальной фазы роста. При этом, несмотря на наблюдаемое 10-кратное повышение уровня ATP_{ex} , его доля среди общего пула ATP (ATP_{tot}) составляет не более 3%. Можно ожидать, что при нарушении проницаемости клеточной мембраны в присутствии эффектора будет наблюдаться увеличение уровня ATP_{ex} .

При достижении насыщающей концентрации клетки перестают делиться, и наблюдается пере-

ход в стационарную фазу – уровень ATP_{ex} снижается, что связано, по-видимому, с изменением состава культуральной жидкости и рН среды в процессе деления и роста клеток. Чем выше активность микроорганизма, тем раньше меняются физико-химические показатели среды, в результате чего скорость гидролиза внеклеточного ATP_{ex} увеличивается. Этот эффект особенно заметен при высокой концентрации клеток (233 млн КОЕ/мл, см. рис. 1в).

Таким образом, аналитическим показателем эффективности действия антибиотика является отсутствие снижения ATP_{ex} через 3–4 ч инкубации, свидетельствующее, как минимум, о бактериостатическом действии антибиотика – деление клеток не происходит и как следствие, состав инкубационной среды не изменяется.

Баланс по ATP (ATP_{tot} , ATP_{in} и ATP_{ex}) приведен в качестве примера для высокой концентрации гентамицина (71 мкг/мл) при различных концентрациях клеток (см. рис. 2).

Через 1 ч инкубации наблюдается незначительное увеличение исходного уровня ATP_{in} , соответствующее стадии взаимодействия гентамицина с компонентами клеточной поверхности,

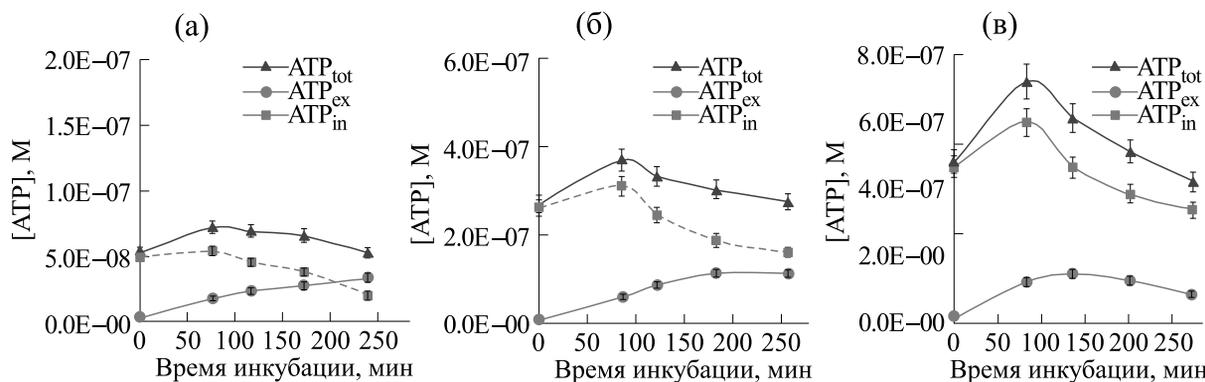


Рис. 2. Кинетика изменения концентрации ATP_{tot} , ATP_{in} и ATP_{ex} в процессе инкубации клеток *E. coli* с гентамицином (71 мкг/мл). Начальные концентрации клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

диффузии внутрь клетки и связывания с мишенью, что, по-видимому, отражает протекание стадии EDP-1. Действительно, известно, что поглощение аминогликозидов клетками протекает быстро и эффективно — по данным авторов работы [9], через 60 мин при средней концентрации 2.0 мкг/мл в питательной среде соотношение внутриклеточного и внеклеточного гентамицина составляет примерно 1500:1. Можно ожидать, что к этому моменту практически весь антибиотик находится в клетках. Как видно, гентамицин не влияет на АТФазную активность, фермент продолжает функционировать и синтезирующийся АТФ расходуется на адаптацию и выживаемость в присутствии химического стрессора. На этом этапе средняя скорость накопления ATP_{ex} , в отличие от скорости накопления ATP_{in} , слабо зависит от концентрации гентамицина (см. рис. 3) и концентрации клеточной суспензии.

Через 80 мин АТФ-синтазы не способны компенсировать потери АТФ, и наблюдается плавное снижение уровня ATP_{in} во многом за счет его транспорта из поврежденных клеток (стадия

EDP-2). Через 4 ч инкубации с гентамицином уровень ATP_{in} снизился в 1.3–2.5 раза ниже исходного в зависимости от концентрации клеток, и наблюдалось преимущественно бактерицидное действие гентамицина. Таким образом, изучение кинетики распределения АТФ внутри и вне клеток позволяет сделать выводы о степени бактерицидного/бактериостатического действия агента, наблюдать не только за гибелью клеток во времени, но и образованием персистеров.

Кинетика изменения Luc_{in} и Luc_{ex} . Анализ кинетических кривых Luc_{in} показал, что в области низких концентраций гентамицина (0.1–0.6 мкг/мл) и контрольном образце (рис. 4, кривые 4, 5 и К) начальная скорость синтеза фермента практически одинакова, однако через 2 ч инкубации в присутствии гентамицина синтез люциферазы замедляется. Рост люциферазной активности свидетельствует о сохранении в образце большого количества метаболически активных клеток, способных к делению. Действительно, результаты определения АТФ внутри и вне клетки (см. рис. 1) полностью повторяют эту картину, кривые на-

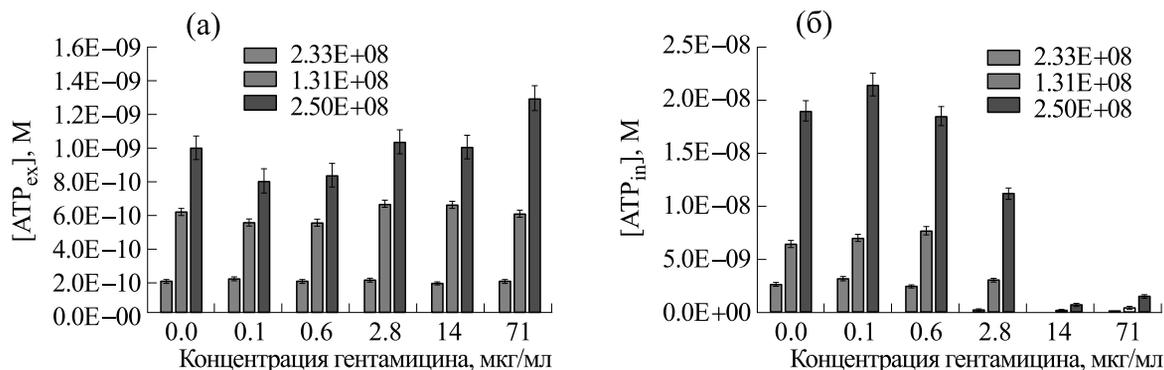


Рис. 3. Зависимость средних начальных скоростей изменения концентрации ATP_{ex} (а) и ATP_{in} (б) от концентрации гентамицина при различных концентрациях клеточной суспензии *E. coli* (25, 131 и 233 млн КОЕ/мл).

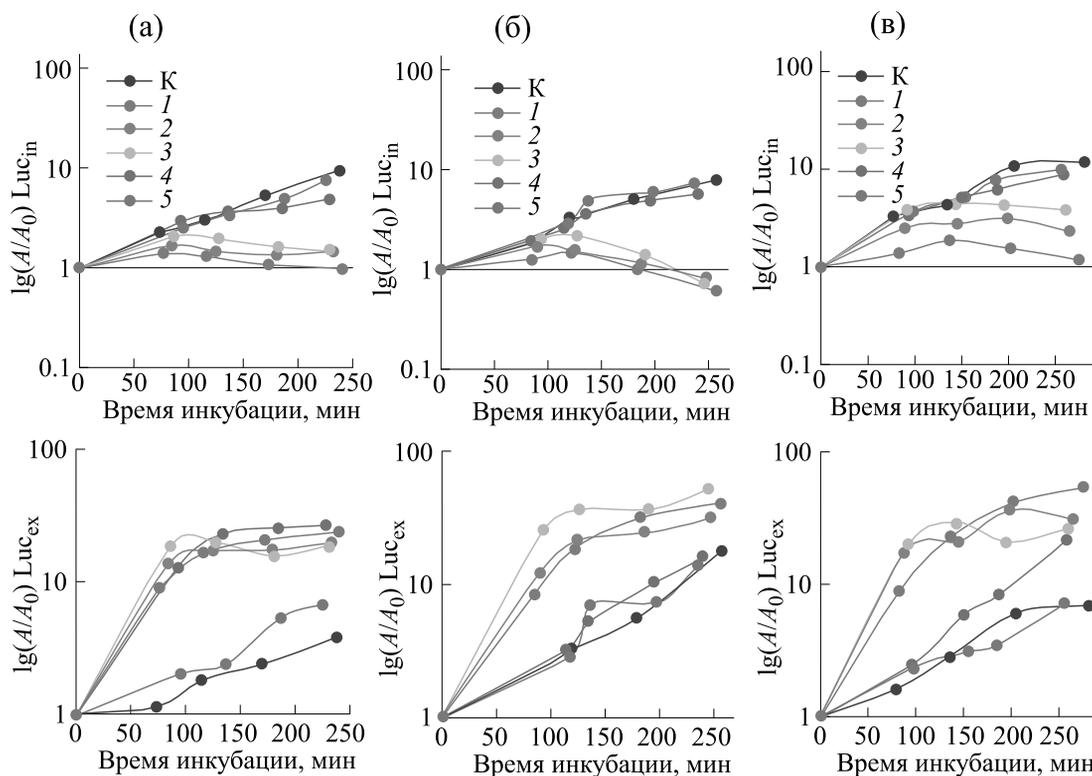


Рис. 4. Кинетика изменения относительной активности Luc_{in} (верхний ряд графиков) и Luc_{ex} (нижний ряд графиков) в процессе инкубации клеток *E. coli* в присутствии гентамицина в полулогарифмических координатах. Исходная концентрация клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Концентрации гентамицина, мкг/мл: кривая 1 – 71, кривая 2 – 14, кривая 3 – 2.8, кривая 4 – 0.6, кривая 5 – 0.1, кривая «К» – 0. Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

копления $\text{AT}\Phi_{\text{in}}$ практически не отличаются от контроля. Очевидно, что указанные концентрации антибиотика лежат ниже минимальной ингибирующей концентрации.

В области высоких концентраций антибиотика (2.8–71 мкг/мл) уже на начальном этапе проявляется ингибирующее действие гентамицина на рибосомы – скорость синтеза активной Luc_{in} снижается по сравнению с контролем (кривые 1–3). Через 80 мин наблюдается максимум Luc_{in} , величина которого зависит от концентрации добавленного агента, с последующим дальнейшим снижением активности Luc_{in} , что подтверждает данные, полученные для $\text{AT}\Phi_{\text{in}}$, об отсутствии деления клеток и их гибели.

Накопление внеклеточной люциферазы Luc_{ex} происходит в результате деления клеток, а также свидетельствует о протекании необратимых изменений мембраны и увеличении доступности эндогенного фермента в результате действия гентамицина. При делении клеток лишь малая часть люциферазы попадает во внеклеточное пространство – в контрольном образце наблюдается незначительное накопление Luc_{ex} , уровень биолюминесцентного сигнала, характеризующего

активность фермента, вырос всего с 0.5 до 2000 RLU, что согласуется с данными для $\text{AT}\Phi_{\text{ex}}$, в то время как сигнал для Luc_{in} за 250 мин увеличился существенно больше – с 7 до 240000. При малых концентрациях антибиотика сохраняется схожая картина, его присутствие не отражается на функционировании клеток – они продолжают делиться и синтезировать люциферазу. При высоких концентрациях наблюдается значительное увеличение скорости накопления Luc_{ex} , которая более чем на порядок превышает скорость накопления Luc_{in} , что связано с необратимым повреждением клеточной мембраны, за которую отвечает вторая энергозависимая фаза EDP-2, в процессе которой происходит связывание гентамицина с рибосомами [9, 11]. Наступление этой фазы соответствует началу ингибирования синтеза белка и потере жизнеспособности клеток [8, 11].

Таким образом, внутриклеточная люцифераза может служить стабильным высокомолекулярным маркером скорости трансляции и проницаемости клеточной мембраны.

Определение минимальной ингибирующей концентрации гентамицина. Минимальную ингибирующую концентрацию гентамицина рассчитывали

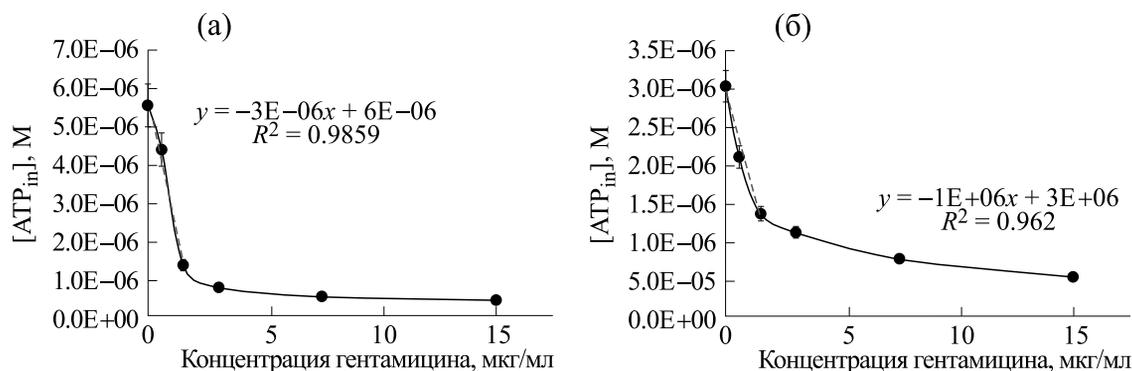


Рис. 5. Зависимость концентрации АТФ_{in} (а) и величины биолюминесцентного сигнала для Luc_{in} (б) от концентрации гентамицина через 180 мин инкубации. Исходная концентрация клеточной суспензии *E. coli* – 200 млн КОЕ/мл. Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

по начальному линейному участку графиков зависимости концентрации АТФ_{in} (рис. 5а) и активности Luc_{in} (рис. 5б) от концентрации гентамицина через 180 мин инкубации клеток с антибиотиком, по АТФ она составила 3 мкг/мл, по Luc_{in} – 2 мкг/мл. Эти результаты находятся в соответствии с литературными данными [14], где минимальная ингибирующая концентрация гентамицина для штаммов *E. coli* дикого типа составила 2 мкг/мл. Таким образом, люцифераза является чувствительным индикатором функционирования рибосом – мишени действия гентамицина, поскольку синтез фермента напрямую зависит от их активности, в то время как изменение АТФ_{in} является результатом многих разнонаправленных внутриклеточных процессов и отвечает за суммарную жизнеспособность клетки в целом.

Функционирование клеток *E. coli* после отделения антибиотика. Образцы клеток (концентрация гентамицина 71, 2.8 и 0.1 мкг/мл), обработанные

гентамицином в течение 4 ч, центрифугировали для отделения антибиотика, помещали в свежую питательную среду LB, инкубировали 18 ч (37°C, 230 об/мин) и анализировали на содержание АТФ_{in} и Luc_{in} по стандартной схеме. Сравнение АТФ_{in} и Luc_{in} до отделения гентамицина (через 4 ч инкубации) и после (через 18 ч) представлено на рис. 6. Как видно, при инкубации образца с высокой концентрацией гентамицина (71 мкг/мл), где после обработки гентамицином наблюдалось снижение АТФ_{in} ниже исходного уровня, после отделения антибиотика содержание АТФ снизилось в 5 раз, клетки утратили жизнеспособность, гибель клеток продолжилась, деление клеток не возобновилось. В образце с низкой концентрацией гентамицина (0.1 мкг/мл), где погибло ~25% клеток, этой концентрации оказалось недостаточно для массовой гибели клеток, остальные продолжили функционировать и возобновили деление. В образце с концентрацией гентамицина 2.8 мкг/мл 10% клеток сохранили способность к делению и после отделения анти-

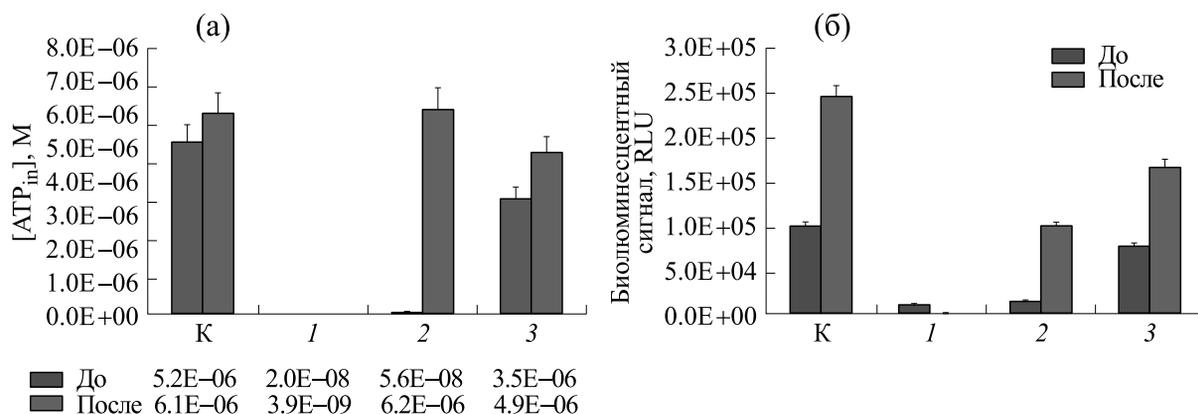


Рис. 6. Концентрации АТФ_{in} (а) и величины биолюминесцентного сигнала для Luc_{in} (б) до (через 4 ч инкубации с гентамицином) и после отделения гентамицина и инкубации в жидкой питательной среде LB, 18 ч, 37°C, 230 об/мин. Концентрации гентамицина, мкг/мл: 1 – 71, 2 – 2.8, 3 – 0.1, «К» – 0.

биотика наблюдалось бурное деление выживших клеток — наличие гентамицина внутри клетки не мешало росту популяции и возобновлению синтеза люциферазы. Таким образом, эффективность действия аминогликозида зависит от его насыщающей концентрации внутри клетки. При низких концентрациях антибиотика он титрует только часть большого числа рибосом и клетки продолжают функционировать. При более высоких концентрациях происходит ингибирование большинства рибосом и синтез белка нарушается. Эти данные подтверждают результаты, полученные для Luc_{in} — в образце 1 люциферазная активность отсутствовала, в контроле и образцах 2 и 3 люциферазная активность внутри клетки увеличилась более чем в 2 раза, что согласуется с данными о росте ATP_{in} — клетки метаболически активны и синтезирующийся АТФ расходуется на функционирование рибосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали возможность использования тест-системы на основе живых клеток *E. coli*, продуцирующей термостабильную рН-нечувствительную люциферазу светляков для изучения эффективности действия аминогликозидов. В присутствии аминогликозидов не наблюдалось снижения ATP_{in} до нулевых значений, остаточное содержание свидетельствует о сохранении клетками жизнеспособности и способности к делению (образование персистеров); увеличение ATP_{ex} и Luc_{ex} свидетельствует о необратимых повреждениях клеточной мембраны, изменение скорости синтеза Luc_{in} является прямым маркером функционирования рибосом, которые являются мишенью действия аминогликозидов и в конечном итоге, жизнеспособности клеточной популяции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lomakina G. Y., Modestova Y., and Ugarova N. N. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, **80** (6), 701–713 (2015). DOI: 10.1134/s0006297915060061
- Lomakina G. Y., Fomina A. D., and Ugarova N. N. Kinetics of interaction of digitonin and its analogues with HEK293 cells studied by the bioluminescence method. *Moscow Univer. Chem. Bull.*, **75** (3), 186–194 (2020). DOI: 10.3103/S0027131420030086
- Lomakina G. Y. and Ugarova N. N. *Luciola mingrellica* firefly luciferase as a marker in bioluminescent immunoassays. *Biophys. Rev.*, **15**, 955–962 (2023), DOI: 0.1007/s12551-023-01115-z
- Lomakina G. Y., Ugarova N. N. Application of bioluminescent methods to study the effect of the membrane-active antibiotic colistin on bacterial cells. *Photochem. Photobiol.*, **98** (5), 1077–1083 (2022). DOI: 10.1111/php.13606
- Lomakina G. Yu., Ugarova N. N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells. *Biophys. Rev.*, **14**, 887–892 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00978-y
- Lomakina G. Y. and Ugarova N. N. Kinetics of the inter-action of colistin with live *Escherichia coli* cells by the bioluminescence method. *Moscow Univer. Chem. Bull.*, **77** (1), 42–47 (2022). DOI: 10.3103/S0027131422010059
- Garneau-Tsodikova S. and Labby K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med. Chem. Comm.*, **7** (1), 11–27 (2016). DOI: 10.1039/C5MD00344J
- Bryan L. E. and Van Den Elzen H. M. Gentamicin accumulation by sensitive strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **28** (9), 696–703 (1975).
- Heller A. H., Spector R., and Aalyson M. Effect of sodium chloride on gentamicin accumulation by *Escherichia coli*: correlation with bacterial growth and viability. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **33** (6), 604–613 (1980).
- Vanhoof R., Sonck P., and Hannecart-Pokorni E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **35** (1), 167–171 (1995).
- Bryan L. and van der Elzen H. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12** (2), 163–177 (1977).
- Ramirez M. S. and Tolmasky M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.*, **13** (6), 151–171 (2010). DOI: 10.1016/j.drup.2010.08.003
- Eisenberg E.S., Mandel L.J., Kaback H.R., Miller M.H. 1984. Quantitative association between electrical potential across the cytoplasmic membrane and early gentamicin uptake and killing in *Staphylo-*

- coccus aureus. *J. Bacteriol.*, **157** (3), 863–867 (1984). DOI: 10.1128/jb.157.3.863-867.1984
14. El Khoury J. Y., Zamarreño Beas J., Huguenot A., Py B., and Barras F. Bioenergetic state of *Escherichia coli* controls aminoglycoside susceptibility. *mBio*, **14** (1), e03302-22 (2023). DOI: 10.1128/mbio.03302-22
15. Koksharov M. I. and Ugarova N. N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel.*, **24** (11), 835–844 (2011). DOI: 10.1093/protein/gzr044
16. Smirnova D. V., Samsonova J. V., and Ugarova N. N. The bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to a synthetic dye and its application for the rapid homogeneous immunoassay of progesterone. *Photochem. Photobiol.*, **92** (1), 158–165 (2016). DOI: 10.1111/php.12556
17. Pu Y., Li Y., Jin X., Tian T., Ma Q., Zhao Z., Lin S. Y., Chen Z., Li B., Yao G., Leake M. C., Lo C. J., and Bai F. ATP-Dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Mol. Cell.*, **73** (1), 143–156 (2019). DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.022
18. Shan Y., Brown Gandt A, Rowe S. E., Deisinger J. P., Conlon B. P., and Lewis K. ATP-Dependent persister formation in *Escherichia coli*. *mBio*, **8** (1), e02267-16 (2017). DOI: 10.1128/mBio.02267-16

Bioluminescent Test System Based on Recombinant *L. mingrelica* Firefly Luciferase as a Means of Investigating the Efficacy of Gentamicin Effect on *E. coli* Living Cells

G.Yu. Lomakina*, S.S. Kaminskaya*, **, and N.N. Ugarova*

*Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

**Department of Fundamental Sciences, N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

This paper highlights the possibilities of applicability of a test system based on *E. coli* BL-21 Codon Plus (DE3) living cells expressing pH-tolerant thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase to study the kinetic mechanism by which aminoglycosides, such as gentamicin used in this study, act taking into account changes in the ATP and firefly luciferase levels inside and outside the cells. It has been shown that it is possible to evaluate the changes in cell viability, assess the effectiveness of the antibiotic action, and predict the formation of persisters after incubation of bacteria with antibiotic for 3 hours. The method is promising for rapid primary high-throughput screening of antibacterial agents and dosage forms to assess their effectiveness and mechanism of action.

Keywords: firefly luciferase, bioluminescence, aminoglycosides, gentamicin, *E. coli*

УДК 547.556.31

БЛОКАТОРЫ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ОСНОВЕ АЗОБЕНЗОЛА С УПРАВЛЯЕМОЙ СВЕТОМ МЕСТНОАНЕСТЕТИЧЕСКОЙ И АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. А.Н. Ноев*, **, #, С.Г. Коваленко***, ****, Э.Д. Гатаулина*****,
Е.А. Турчанинова***, В.Д. Джабраилов***, А.А. Аитова***, Д.А. Лихобабина*,
Ж.А. Сутемьева*, Ш.Р. Фролова***, ****, Л.Э. Руппель***, Д.А. Минаков*, Н.В. Суворов*,
П.В. Островерхов*, Ю.Л. Васильев*****, М.В. Николаев*****, В.А. Цвеляя***, ****, *****,
К.И. Агладзе***, ****, М.А. Грин*

*МИРЭА – Российский технологический университет, просп. Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

**Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального
медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 2-й Боткинский пр-д, 3, Москва, 125284, Россия

***Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Институтский переулок, 9, Долгопрудный Московской области, 141701, Россия

****Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского,
ул. Щепкина, 61/2, Москва, 129110, Россия

*****Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

*****Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ РФ
(Сеченовский Университет), Трубецкая ул., 8/2, Москва, 119048, Россия

*****Национальный исследовательский университет ИТМО,
Кронверкский просп., 49А, Санкт-Петербург, 197101, Россия

#E-mail: aleksej-noev@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 08.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Работа посвящена синтезу новых управляемых светом блокаторов потенциал-зависимых натриевых Na_v -каналов на основе азобензола и изучению их местноанестетических и антиаритмических свойств. Действие этеркаина и двух его новых производных на нативные Na_v -каналы изучено *in vitro* с помощью метода пэтч-кламп на изолированных возбудимых клетках (нейронах и кардиомиоцитах) крыс, а также оценена их местная анестетическая активность на роговице глаза кролика *in vivo*. Выполнены исследования влияния полученных соединений на проводимость волн возбуждения в культурах кардиомиоцитов с использованием метода оптического картирования. Эффективная зависимость от света биологическая активность этеркаина и его производных позволяет рассматривать полученные соединения как потенциальные инструменты для управляемой светом местной анестезии, а также для неинвазивной абляции очагов аритмии в сердце в кардиологии.

Ключевые слова: фотофармакология, блокаторы Na_v -каналов, азобензолы, местные анестетики, антиаритмики.

DOI: 10.31857/S0006302924030144, EDN: OEXUZP

Блокаторы потенциал-зависимых натриевых (Na_v) каналов широко используются в медицине в качестве местных анестетиков и антиаритмиков [1–5]. К препаратам данного класса относятся лидокаин, прокаинамид, артикаин, бупивакаин и

др. Несмотря на повсеместное использование, указанные лекарственные средства обладают рядом побочных эффектов, в том числе системной токсичностью, обусловленной неселективным действием на различные изоформы Na_v -каналов, а также на другие молекулярные мишени [4–7]. Среди подходов к созданию более безопасных местных анестетиков и антиаритмиков можно выделить использование наноструктурирован-

Сокращения: ЯМР – ядерный магнитный резонанс, ДМСО-d6 – дейтерированный диметилсульфоксид, УФ – ультрафиолетовый.

ных средств доставки, использование пролекарств, а также создание агентов, биологическая активность которых может регулироваться под внешним воздействием, в том числе светом [8–12]. Последний подход получил название фотофармакологии [10, 11, 13].

Управляемые светом блокаторы Na_v -каналов нашли свое применение в качестве инструментов в различных фундаментальных исследованиях, в особенности в нейробиологии. Основными возможными областями применения управляемых светом блокаторов Na_v -каналов в медицине является разработка на их основе новых управляемых светом местных анестетиков, а также антиаритмиков. Использование подобных анестетиков позволяет ограничить область действия анестезии и снизить количество системных побочных эффектов [14–16]. В свою очередь, управляемые светом антиаритмики могут использоваться для интраоперационного определения участков, подлежащих модулированию с помощью процедуры абляции. Такой подход может позволить увеличить эффективность лечения аритмий и минимизировать количество необходимых инвазивных процедур [17–19].

К известным управляемым светом блокаторам Na_v -каналов относятся производные азобензола: QAQ и его производные [20–22], azoTAB и фотокантин [17, 18, 23], а также с-TAB на основе стильбена [19]. AzoTAB в исследованиях *in vitro* проявлял высокую цитотоксичность, что послужило поводом для создания его более безопасного аналога на основе стильбена – с-TAB, который, однако, блокировал проводимость в обеих (*цис*- и *транс*-) формах, таким образом, не обеспечивая необходимого управления светом [19]. В свою очередь, молекула QAQ неспособна проникать через мембраны клеток, что ограничивает возможность ее клинического применения [14, 17, 19, 20]. Таким образом, создание новых блокаторов Na_v -каналов на основе азобензола является весьма актуальной задачей.

Целью данной работы было получение новых блокаторов Na_v -каналов на основе азобензола и исследование их местноанестетических и антиаритмических свойств с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные растворители были подготовлены и очищены по стандартным методикам. Для колоночной хроматографии был использован силикагель 40/60 (Merck, Германия). Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем Kieselgel 60 F245 (Merck, Германия). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) заре-

гистрированы на спектрометре DPX300 (Bruker, США) в CDCl_3 , ДМСО- d_6 (дейтерированном диметилсульфоксиде). Для калибровки использовали сигналы остаточных растворителей.

Исследования проводили с использованием самок и самцов крыс линии Wistar возрастом 3–4 суток (для исследований с использованием кардиомиоцитов) и 13–19 суток (для исследований с использованием нейронов головного мозга). В качестве анестезиометра использовали самостоятельно собранный прибор с фиксированной длиной нейлоновой лески ($l = 1.0$ см, $d = 0.125$ мм), сходный по конструкции с анестезиометром filamentного типа Cochet-Bonnet.

Химический синтез. Получение 4-(хлорацетамидо)-азобензола (соединения 3). Триэтиламин (0.565 г, 0.58 ммоль) добавили к раствору 4-аминоазобензола (соединение 2) (1.000 г, 5.07 ммоль) в 15 мл дихлорметана, смесь охладил до 0–5°C и добавили хлорацетилхлорид (0.625 г, 0.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре и после завершения реакции (контролировали с помощью тонкослойной хроматографии) экстрагировали этилацетатом (3×30 мл) из воды (100 мл). Органические слои объединили, промыли насыщенным раствором NaCl и осушили Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. Соединение 3 (в виде светло-коричневых кристаллов) было получено с выходом 97%. $R_f(\text{SiO}_2, \text{гексан/этилацетат} = 1:1) = 0.75$.

Спектр ^1H -ЯМР соединения 3 (Приложение, рис. S3) (300 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 8.41 (s, 1H, 1×NH), 7.98–7.89 (m, 4H, 4×CH), 7.74 (m, 2H, 2×CH), 7.54–7.47 (m, 3H, 3×CH), 4.23 (s, 2H, 1×CH₂). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения 3 (Приложение, рис. S4) (75 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 164.0, 152.8, 149.8, 139.2, 131.1, 129.2, 124.1, 122.9, 120.3, 43.0. MS (ESI⁺) (Приложение, рис. S5) m/z : [M–H]⁺, рассчитано 272.06, найдено 272.10.

Получение 4-((N-морфолино)ацетамидо)-азобензола (соединения 4a). К раствору соединения 3 (0.200 г, 1.01 ммоль) в ацетонитриле (4 мл) добавили морфолин (0.097 г, 1.11 ммоль). Через 5 мин к смеси добавили K_2CO_3 (0.420 г, 3.04 ммоль) и KI (0.168 г, 1.01 ммоль). Смесь перемешивали 4 ч при кипячении. После завершения реакции (контролировали с помощью тонкослойной хроматографии) растворитель был удален при пониженном давлении, после чего смесь экстрагировали этилацетатом (3×30 мл) из воды (100 мл). Органические слои объединили, промыли насыщенным раствором NaCl и осушили Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был очищен колоночной хроматографи-

ей (SiO_2 , этилацетат). Итоговый выход соединения **4a** (в виде оранжевых аморфных кристаллов) составил 45 %. R_f (SiO_2 , этилацетат) = 0.55.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **4a** (Приложение, рис. S6) (300 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 10.10 (s, 1H, $-\text{NH}$), 7.87–7.82 (m, 6H, $6 \times \text{CH}$), 7.58–7.50 (m, 3H, $3 \times \text{CH}$), 3.62 (t, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.16 (s, 2H, $1 \times \text{CH}_2$), 2.48–2.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **4** (Приложение, рис. S7) (75 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 168.6, 152.0, 147.6, 141.7, 131.0, 129.3, 123.5, 122.3, 119.6, 66.0, 62.0, 53.1. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S8) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано 325.17, найдено 325.10.

Получение гидрохлорида 4-((N-морфолино)ацетамидо)-азобензола (соединения 4). К раствору соединения **4a** (0.050 г, 0.15 ммоль) в 6.0 мл Et_2O , охлажденному до 0°C , добавили 0.2 мл 1.25 М раствора $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 0°C , после чего продукт сконцентрировали при пониженном давлении. Соединение **4** (в виде светло-желтых кристаллов) было получено с количественным выходом. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S9) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано 325.17, найдено 325.30.

Получение 4'-гидроксиазобензол-4-карбоновой кислоты (соединения 6). К раствору соединения **5** (5.00 г, 36.46 ммоль) в 6 мл воды добавили концентрированный водный раствор HCl (36.6%, 5 мл). Полученную смесь перемешивали при 0 – 5°C в течение 15 мин. Затем при 0 – 5°C добавили раствор NaNO_2 (2.52 г, 36.46 ммоль) в воде (6 мл) по каплям в течение 10 мин, после чего смесь перемешивали 30 мин при охлаждении. Затем раствор фенола (3.34 г, 36.46 ммоль) в NaOH (16%, 4.7 М, 15 мл) добавили к раствору соли диазония по каплям в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0 – 5°C , после чего pH раствора был доведен до 4.0. Выпавший осадок был отфильтрован, высушен и очищен при помощи перекристаллизации в этаноле. Выход соединения **6** (в виде темно-красных кристаллов) составил 48% (4.20 г). R_f (SiO_2 , ЭА + CH_3COOH) = 0.75.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **6** (Приложение, рис. S10) (300 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 8.08 (d, 2H, $J = 8.6$ Гц, $2 \times \text{CH}$), 7.77 (m, 4H, $4 \times \text{CH}$), 7.00 (d, 2H, $J = 8.9$ Гц, $2 \times \text{CH}$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **6** (Приложение, рис. S11) (75 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 169.50, 162.58, 152.68, 144.77, 140.92, 129.97, 124.80, 121.05, 116.27. МС (ESI^+) m/z : $[\text{M} + 2\text{Na} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}_2)^+$ 287.03, найдено 287.00.

Получение 2-(N-морфолино)-этил 4'-(2-(N-морфолино)-этокси)-азобензол-4-карбоксилата (соединения 7). К раствору соединения **6** (700 мг,

2.89 ммоль) в N,N -диметилформамиде (15 мл) добавили K_2CO_3 (1599 мг, 11.57 ммоль) при перемешивании. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. В смесь добавили гидрохлорид N -(2-хлорэтил)-морфолина (1075 мг, 5.78 ммоль) и KI (480 мг, 2.89 ммоль), после перемешивали при кипячении 6 часов, а затем экстрагировали (вода/этилацетат). Органический слой был промыт насыщенным раствором NaCl и осушен с помощью Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 10:1), выход соединения **7** (в виде оранжевых кристаллов) составил 77% (112 мг). R_f (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 10:1) = 0.58.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **7** (Приложение, рис. S12) (300 МГц, хлороформ- d) δ , м.д.: 8.14 (d, 2H, $J = 8.8$ Гц, $2 \times \text{CH}$), 7.91 (m, 4H, $4 \times \text{CH}$), 7.01 (d, 2H, $J = 9.1$ Гц, $2 \times \text{CH}$), 4.7 (t, 2H, $J = 5.9$ Гц, CH_2), 4.19 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 3.72 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$), 2.80 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.57 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **7** (Приложение, рис. S13) (75 МГц, хлороформ- d) δ , м.д.: 166.03, 161.91, 155.48, 147.18, 131.36, 130.67, 125.27, 122.47, 115.00, 67.06, 67.00, 66.36, 62.64, 57.59, 57.21, 54.21, 53.97. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S14) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5)^+$ 469.24, найдено 469.40.

Получение 4'-(2-(N-морфолино)-этокси)-азобензол-4-карбоновой кислоты (соединения 8). К раствору соединения **7** (500 мг, 1.1 ммоль) в смеси растворителей диметилсульфоксид/вода = 6:1 (10 мл) был добавлен KOH (0.500 г, 8.9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 90 – 100°C , после чего экстрагировали (вода/этилацетат с добавлением соляной кислоты). Органический слой был осушен с помощью Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Выход соединения **8** (в виде оранжевых кристаллов) составил 62% (234 мг). R_f (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 7:1) = 0.70. Спектр ^1H -ЯМР соединения **8** (Приложение, рис. S15) (300 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 8.11 (d, 2H, $J = 8.9$ Гц, $2 \times \text{CH}$), 7.90 (m, 4H, $4 \times \text{CH}$), 7.15 (d, 2H, $J = 9.1$ Гц, $2 \times \text{CH}$), 4.21 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 3.58 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.73 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **8** (Приложение, рис. S16) (75 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 166.75, 161.80, 154.41, 146.20, 132.31, 130.52, 124.93, 122.16, 115.23, 66.13, 65.89, 56.83, 53.55. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S17) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4)^+$ 356.16, найдено 356.30.

Биологические исследования. *Выделение пирамидных нейронов гиппокампа крыс и проведение исследований методом пэтч-кламп на нейронах.* После анестезии севофлуораном животных декапировали. Мозг извлекали и помещали в холодный раствор (2–4°C) следующего состава (в мМ): NaCl – 124, KCl – 5, CaCl₂ – 1.3, MgCl₂ – 2, NaHCO₃ – 26, NaH₂PO₄ – 1.24, D-глюкоза – 10, pH 7.4, при аэрации карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). С помощью вибратора приготавливали поперечные срезы гиппокампа.

Пирамидные нейроны зоны CA1 изолировали методом вибродиссоциации. Токи, опосредованные активацией Na_v-каналов, регистрировали с помощью пэтч-кламп-усилителя ЕРС-10 (НЕКА Elektronik, Германия). Мембранные потенциалы клетки фиксировали на уровне –100 мВ. Для активации каналов использовали короткую (30 мс) деполяризующую ступеньку до уровня –20 мВ. Периодичность стимуляции 10 с.

Состав внеклеточного раствора (в мМ): NaCl – 143, KCl – 5, CaCl₂ – 2.5, D-глюкоза – 10, TEA-Cl – 10, 4-AP – 4, CdCl₂ – 0.1, HEPES – 10, pH 7.4 (с помощью HCl), $t = 22–24^{\circ}\text{C}$. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (WPI). Состав раствора для заполнения пипеток (в мМ): CsF – 100, CsCl – 40, NaCl – 5, CaCl₂ – 0.5, ЭГТА – 5, HEPES – 10, pH 7.2 (с помощью CsOH), $t = 22–24^{\circ}\text{C}$. Вещества добавляли во внеклеточный раствор и подавали локально на клетку с помощью системы быстрой перфузии RSC-200 (BioLogic, Франция). В качестве источника монохроматического света использовали светодиоды (Mightex, Канада), которые с помощью световода подключали к инвертированному микроскопу Ti-2 (Nikon, Япония). Свет фокусировали в области тела нейрона с помощью объектива 40×. Эффекты веществ оценивали по соотношению $I_{\text{drug}}/I_{\text{control}}$, где I_{control} и I_{drug} – токи в контроле и в присутствии вещества соответственно. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение и получены как минимум из 5 экспериментов. Данные анализировали с помощью программы Origin 9.1 (OriginLab Corp, США).

Выделение клеточной культуры кардиомиоцитов. Был использован протокол двухдневной изоляции, базирующийся на существующем протоколе Worthington-Biochem. В первый день сердца извлекали из крысят (*Rattus norvegicus*, порода Wistar) в возрасте 2–4 суток и немедленно помещали в сбалансированный раствор Хэнкса, не содержащий ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (Cat. N 14180046, Gibco, США), на льду. Выделяли только ткань желудочков, отсекали около 50–60% исходной массы сердца, которая включала синоатриальный узел, предсердия и атриоventрикулярный узел. Выделенные желудочки измельчали на мелкие

кусочки и оставляли на 16 ч при температуре 4°C в растворе трипсина. На второй день клетки помещали в раствор коллагеназы (2/25 мкг/мл, Cat. N 17101015, Gibco, США) и перемешивали в течение часа при 37°C. Суспензию клеток помещали в матрас Т75 на 1 ч для предварительного посева и отделения фибробластов от культуры кардиомиоцитов. Затем клетки подсчитывали с помощью трипанового синего (Cat. N 15250061, Gibco, США) и концентрацию клеток доводили до 10⁶ кл./мл. Выделенные клетки из суспензии (содержащей ~70–80% кардиомиоцитов) высевали на покровные стекла, покрытые фибронектином (0.16 мг/мл, Cat. N 33016015, Gibco, США) в концентрации около 2.5·10⁵ кл./см² в случае выращивания монослоя клеток и в концентрации около 5·10⁴ кл./см² в случае одиночных изолированных кардиомиоцитов для работы по методу «пэтч-кламп». Образцы культивировали в культуральной среде DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки в течение первых 24 ч, затем среду меняли на DMEM с 5% фетальной бычьей сыворотки. После 3–5 суток культивирования монослои исследовали с помощью метода оптического картирования.

Проведение исследований методом «пэтч-кламп» на кардиомиоцитах. Токи потенциалзависимых ионных каналов изолированных кардиомиоцитов регистрировали электрофизиологическим методом «пэтч-кламп» в конфигурации «перфорированная целая клетка». Амфотерицин Б (Sigma Aldrich, США) использовали в качестве перфорирующего агента в концентрации 0.24 мг/мл.

Образцы с одиночными изолированными клетками помещали в камеру с внеклеточным раствором. Внеклеточный раствор для записи токов быстрых натриевых каналов I_{Na} содержал 20 мМ NaCl, 1.8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 120 мМ CsCl, 0.002 мМ низолдипина, 10 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4 (CsOH). Пипетку заполняли внутриклеточным раствором, содержащим 135 мМ CsCl, 10 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ ЭГТА, 10 мМ HEPES, 5 мМ MgATP, pH 7.2 (CsOH).

Для экспериментов на одиночных клетках использовали установку «пэтч-кламп», которая состояла из следующих основных компонентов: цифровой преобразователь Digidata 1440A (Axon Instruments, Inc., США), усилитель Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., США), микроманипулятор MP-285 (Sutter Instrument, США), инвертированный микроскоп IX71 (Olympus, Япония), шумоподавитель HumBug (A-M-Systems, США), антивибрационная платформа AVTT75 (DeltaPix, Дания). Температуру внеклеточного раствора поддерживали в камере с помощью автоматиче-

ского регулятора температуры TC-324C (Warner Instruments, США). Для изготовления пипеток был использован пуллер микропипеток P-97 (Sutter Instrument, США), заготовки из боросиликатного стекла BF150-86-10 (Sutter Instrument, США), микроузнака Narishige MF-900 (Tritech Research, Inc., США)). Из боросиликатных заготовок вытягивали пипетки на пуллере с сопротивлением в среднем 3 МОм. Пипетку заполняли внутриклеточным раствором с амфотерицином Б (Sigma Aldrich, США) в качестве перфорирующего агента в концентрации 0.24 мг/мл. С помощью настроек усилителя емкостные компоненты были скомпенсированы. Окончание перфорации мембраны определяли по изменению емкостных токов, приблизительное время перфорации амфотерицином Б составило около 5 мин.

Протокол стимуляции Ramp для записи токов потенциалзависимых быстрых натриевых каналов I_{Nav} имел вид линейного увеличения потенциала от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс. Сначала I_{Nav} с помощью данного протокола регистрировался в контроле. Затем медленно (для предотвращения разрыва контакта между пипеткой и клеткой) заменяли внеклеточный раствор в камере на внеклеточный раствор с исследуемым производным азобензола в *транс*-форме, приготовленный заранее. Затем после инкубации клетки в растворе с веществом в течение как минимум трех минут снова записывали I_{Nav} . Таким образом, были записаны токи I_{Na} в контроле и под действием *транс*-формы определенного производного азобензола на одной и той же клетке. Все эксперименты по регистрации токов под действием производных азобензолов (включая стадии добавления раствора с исследуемым веществом, инкубацией клетки и записи тока после воздействия вещества) проводили в темноте, чтобы избежать изменения конфигурации исследуемого вещества.

Емкость мембраны, измеренная с помощью программного обеспечения pCLAMP10.2, варьировала от 20 до 35 пФ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре ($22-24^{\circ}\text{C}$). Анализ и обработку данных проводили с использованием программ Clampfit 10.2 (Molecular Devices, США) и OriginPro 8.1 (OriginLab Corp., США).

Оптическое картирование на кардиомиоцитах. Для мониторинга активности и регистрации картины возбуждения 3–5-суточные монослои неонатальных кардиомиоцитов крысы загружали Ca^{2+} -чувствительным индикатором Fluo-4-AM (Cat. No F14201, Molecular Probes, США) на 30–45 мин. После окрашивания среду заменяли раствором Тироде (Cat. No T2145-10L, Sigma-Aldrich Co., США), подогретого до температуры 37°C ,

pH 7.4. Перед ультрафиолетовой (УФ) фотосенсибилизацией монослоев в среду добавляли соответствующие исследуемые вещества. Оптическое картирование культуры неонатальных крысиных желудочковых кардиомиоцитов проводили после визуального контроля на световом микроскопе для обнаружения сформировавшегося конфлюэнтного монослоя клеток со спонтанной сократительной активностью. Образец помещали на нагревательную пластину Thermoplate для поддержания физиологической температуры (37°C) в течение всего эксперимента. Для стандартизации условий эксперимента культуре подавали стимуляцию генератором импульсов посредством платинового электрода. Параметры импульса: длительность – 20 мс, амплитуда – 8 В, период между импульсами – 800 мс (1.25 Гц). Были проведены исследования для различной длительности периодов между импульсами – 400, 800 и 1000 мс. Для итоговых результатов использовали период в 800 мс.

Для контроля картины проведения волн возбуждения под воздействием фотосенсибилизатора установка по оптическому картированию была дополнена ультрафиолетовым-светодиодом (~ 365 нм, модель LC-L1V3, Хамамацу, Япония). Свет в экспериментальную камеру подавали с помощью светодиодной головки (L11921, Хамамацу, Япония). Плотность мощности УФ-излучения составляла ~ 170 мВт/см² и измерялась с помощью измерителя мощности лазера Nova II P/N 7Z01550 (Ophir Spiricon Europe GmgH, Германия) на конце светодиодного головного устройства. Вся схема установки для экспериментов представлена в Приложении (рис. S1).

Ход эксперимента по регистрации волн возбуждения под воздействием фотосенсибилизирующих веществ:

1. Регистрация скорости проведения волны возбуждения при спонтанной активности культуры.
2. Регистрация скорости проведения волны возбуждения при стимуляции с помощью электродов с соответствующими характеристиками импульса.
3. Добавление 1 мкл исследуемого соединения в концентрации 50 мкМ в чашку Петри с образцом.
4. Фиксация электрофизиологической активности спустя 5, 10, 30, 60, 90 и 120 мин с момента добавления вещества до полной блокировки проведения волны возбуждения по образцу. Таким образом, удается исследовать уменьшение скорости проводимости культуры (степени блокировки проведения волны возбуждения в образце). В некоторых случаях добавляли дополнительное количество вещества около 1 мкл (до 100 мкМ) исследуемого соединения, если в течение 30–

40 мин не произошла полная блокировка образца.

5. Облучение ультрафиолетовым светом (365 нм) в течение от 10 до 40 с в зависимости от вещества (подбор времени засветки осуществляли индивидуально для каждого соединения на пробных образцах) после полной блокировки активности и стимуляция культуры электродами.

6. Исследование восстановления скорости проведения волны возбуждения на культуре кардиомиоцитов под действием *цис*-формы вещества после засветки УФ в течение 160 мин с момента засветки при периодическом насыщении раствора CO_2 . Регистрацию скорости проведения осуществляли как для случая спонтанной активности, так и при стимуляции с помощью электродов.

7. Замена раствора Тироде (отмывка) после проведения исследований, регистрация спонтанной активности образца и активности со стимуляцией электродами. Отмывки повторяли 3 раза с интервалом около 15 мин для исследования восстановления скорости проводимости культуры после воздействия исследуемого соединения.

8. Очистка образца и фиксация с помощью 4%-го раствора параформальдегида для дальнейших исследований влияния вещества на структуру клеток.

Регистрация скорости происходила при следующих параметрах: разрешение 512×512 пикселей, 130 кадров в секунду.

Первичные данные после эксперимента по оптическому картированию представляли собой последовательность черно-белых изображений, снятых с заданной частотой и с заданным разрешением и образующих видеофрагмент. Далее происходила их обработка с помощью программы ImageJ и ее плагинов (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). При обработке удалялся шум и фоновая засветка, настраивалась контрастность. В программе Wolfram Mathematica 8 результаты представлялись в виде активационных карт. По видеоряду с помощью пространственно-временной развертки можно определить скорость проведения фронта волны по ткани (Приложение, рис. S2). Для этого на всех последовательных изображениях выбирали фиксированное направление и строили зависимость значения яркости для пикселя, принадлежащего этой линии, от номера изображения. С помощью пространственно-временной развертки строили карту, на которой по вертикали откладывали интенсивность пикселей на выбранной прямой, а со сдвигом по горизонтальной оси показывался тот же участок в следующие моменты времени, как количество кадров. Яркая полоса возбуждения отображает фронт волны во времени. Скорость волны считали следующим образом: строили касательную к полоске, которая иллюстрирует фронт волны, и

потом вычисляли тангенс получившегося угла наклона α как отношение размера и времени в единицах пикселей.

Некоторые кадры из видеоряда, как проход одной волны возбуждения по образцу, могут быть выбраны и суммированы на одном изображении в виде активационной карты: цветом обозначен фронт волны в конкретный момент времени. Вся тепловая шкала в данном случае будет обозначать количество кадров, прошедшее с момента инициации волны (обычно: от синего к красному). Шкала в секундах или в кадрах приводится совместно с изображением.

Исследование местноанестетической активности на роговице глаза кролика по методу Ренье. В исследовании использовали ненаркотизированных половозрелых кроликов-самцов породы Советская шиншилла массой 2–3 кг («КролИнфо», Орехово-Зуево, Московская обл., Россия). Животных содержали в стандартных условиях (влажность 50–60%, температура 19–22°C). В помещениях для содержания животных поддерживали 12-часовой цикл освещения, каждое животное содержалось в отдельной клетке. Животным был предоставлен *ad libitum* доступ к стандартному экструдированному комбикорму для кроликов «ЧАРА» (ЗАО «Ассортимент Агро», Тураково, Московская обл., Россия) и чистой питьевой воде, очистку которой проводили с использованием блочно-модульной системы «7 ТЕХНОКОМ» (ООО «7 ТЕХ», Москва, Россия). В качестве отрицательного контроля был выбран 4%-ный водный раствор Kolliphor® ELP, положительным контролем служил 2%-ный раствор лидокаина (Лидокаин, раствор для инъекций 2%, Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь). Для экспериментальных групп и для групп положительного контроля использовали по 4 животных ($n = 8$). Для групп отрицательного контроля использовали по 2 животных ($n = 4$) ввиду предполагаемого отсутствия эффекта и минимизации количества животных в эксперименте. Животных распределяли по группам случайным образом. Перед экспериментом животных фиксировали, оставляя голову свободной. Перед каждым экспериментом у животных выстригали ресницы и определяли базовый порог чувствительности роговицы глаза к тактильному воздействию с помощью анестезиометра.

Эксперименты с животными проводили в помещении с полностью затемненными окнами, в качестве освещения использовался источник света мощностью 50 Вт с длиной волны 625 нм, лежащей вне полос поглощения UV/Vis-спектра исследуемого соединения, находящийся на максимальном удалении от животного. В части экспериментов дополнительно использовали облучение светом с длиной волны 365 нм и выходной мощностью 200 мВт. Перед началом экспериментов со световым воздействием раствор ис-

следуемых соединений предварительно в течение 5 мин облучали светом с длиной волны 365 нм.

Определение чувствительности роговицы глаза кролика с использованием метода поверхностной анестезии (метод Ренье). Исследуемый раствор в объеме 0.2 мл инстиллировали в каждый конъюнктивальный мешок. После этого определяли порог чувствительности роговицы глаза к тактильному воздействию. Первое определение проводили на 8-й минуте опыта и далее на 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60-й минутах (всего 13 значений). Каждый раз отмечали минимальное число прикосновений одинаковой силы и ритма, вызывающее смыкание век (но не более 100). Индекс Ренье рассчитывали как сумму 13 значений в течение 60 мин по формуле:

$$\text{Индекс Ренье} = \sum_{i=1}^{13} n_i,$$

где n — количество прикосновений до смыкания век.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был получен управляемый светом местный анестетик этеркаина гидрохлорид (соединение **1**, схема 1), показавший высокую эффективность и полную обратимость биологического эффекта на модели поверхностной анестезии на роговице глаза кролика [13, 14].

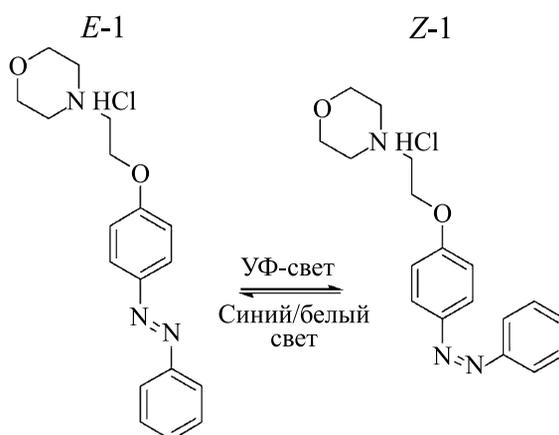
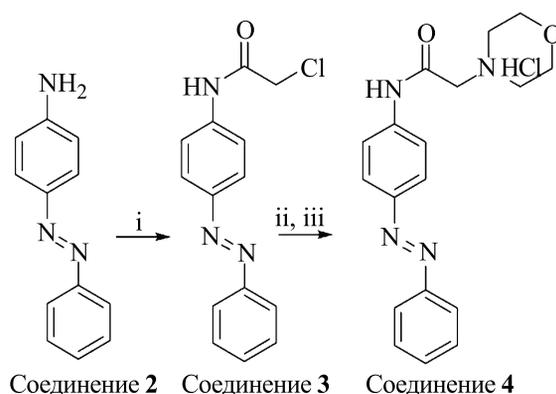


Схема 1. Фотоизомеризация гидрохлорида этеркаина (соединение **1**)

Этеркаин (соединение **1**) имеет в своей структуре линкер с атомом эфирного кислорода, однако большинство используемых в клинической практике местных анестетиков обладает амид-

ным линкером. С целью установления влияния природы линкера на биологическую активность нами был получен амидный аналог этеркаина (соединение **4**, схема 2).



Соединение **2** Соединение **3** Соединение **4**

Схема 2. Получение гидрохлорида 4-((*N*-морфолино)ацетида)-азобензола (соединение **4**). Реагенты и условия: i) хлорацетилхлорид, триэтиламин, дихлорметан, 0–5°C, затем комн. темп.; ii) морфолин, K₂CO₃, KI, *N,N*-диметилформаид, кипячение; iii) 2М HCl/Et₂O, Et₂O, 0–5°C, 30 мин

Одним из недостатков этеркаина является его ограниченная растворимость в воде, что приводит к необходимости использования дополни-

тельных солюбилизаторов. С целью увеличения водорастворимости было получено 4'-карбоксиизобензола производное этеркаина (соединение 8, схема 3).

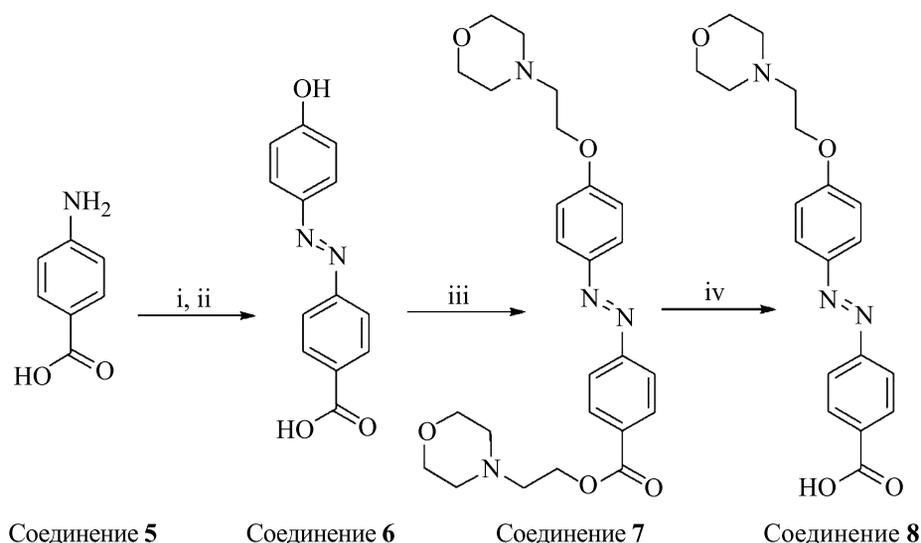


Схема 3. Получение 4'-карбоксиизобензола производного этеркаина (соединение 8). Реагенты и условия: i) HCl, NaNO₂, H₂O, 0–5 °С, 30 мин; ii) фенол, NaOH, H₂O, 0–5 °С, 1 ч; iii) KI, K₂CO₃, диметилформамид, кипячение, 6 ч; iv) KOH, диметилсульфоксид:H₂O = 6:1, 90–100 °С, 4 ч

При алкилировании 4-гидрокси-4'-карбоксиизобензола (соединение 6) наблюдалось образование смеси продуктов замещения по фенольному и карбоксильному кислороду, а также образование ди-замещенного производного 7. Поэтому селективное получение соединения 8 было реализовано за счет использования избытка алкилирующего агента с последующим гидролизом сложноэфирной связи. Структуры всех промежуточных и конечных соединений были подтвер-

ждены методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, а также хромато-масс-спектрометрии.

Спектры поглощения соединений 1, 4, 8 с преобладанием *транс*- (в темноте) и *цис*-форм (при облучении 365 нм) приведены на рисунках 1а и 1б соответственно.

Исследование местноанестетических свойств производных этеркаина *in vivo*. Местноанестетический эффект полученных соединений был оценен на модели роговицы глаза кролика по методу

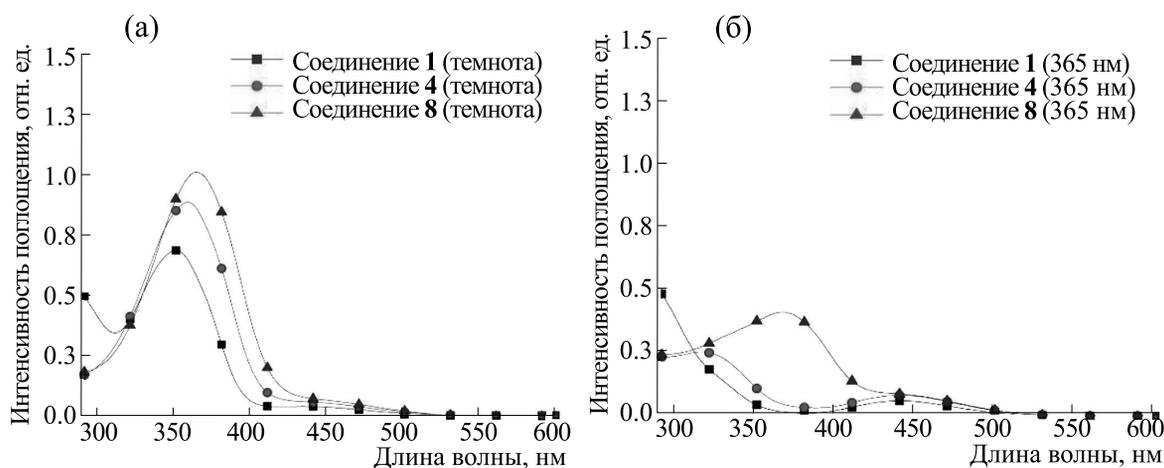


Рис. 1. UV/Vis спектры поглощения соединений 1, 4 и 8 в диметилсульфоксиде: (а) – с преобладанием *транс*-формы (в темноте), (б) – с преобладанием *цис*-формы (при облучении светом 365 нм).

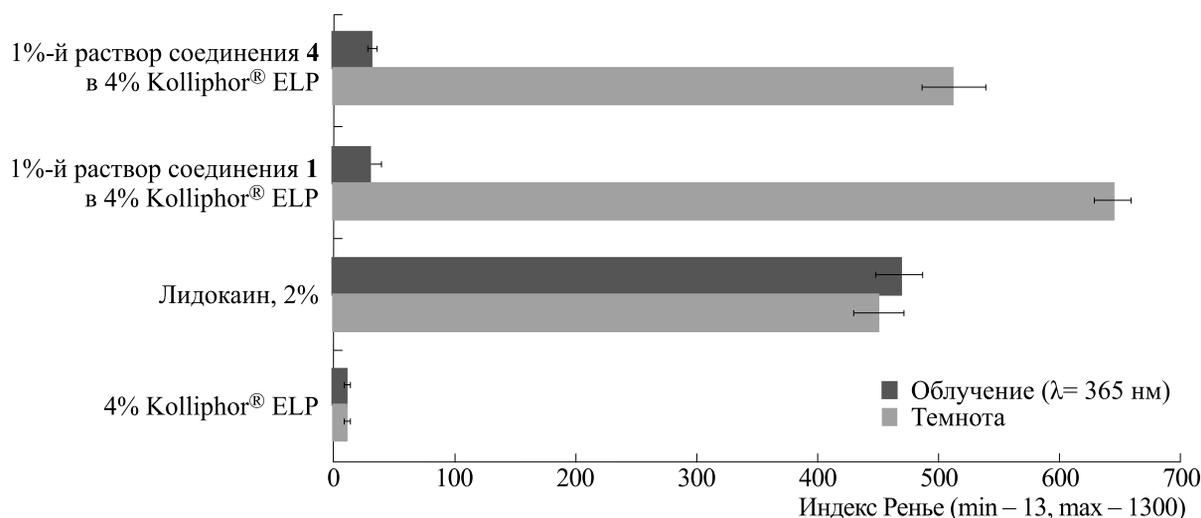


Рис. 2. Результаты исследования местноанестетической активности производных этеркаина по методу Ренье.

Ренье (рис. 2). Количественной оценкой является индекс Ренье, где максимальное значение (1300) свидетельствует о полной анестезии в течение 60 мин, а минимальное (13) – об отсутствии анестезии. Отрицательным контролем служит 4%-ный мицеллярный раствор Kolliphor® ELP, положительным – 2%-ный раствор лидокаина, активность которого не зависит от облучения. Этеркаин (соединение 1) и его производное 4 показывают высокие значения индекса Ренье в темноте (644 ± 30 ($n = 8$) и 512 ± 56 ($n = 8$) соответственно), резко снижающиеся при облучении УФ-светом (32 ± 16 ($n = 8$) и 33 ± 6 ($n = 8$) соответственно), в то время как для лидокаина отсутствовали различия в его значениях при облучении и без него (451 ± 40 ($n = 8$) и 469 ± 37 ($n = 8$) соответственно). Для соединения 8 не удалось добиться воспроизводимости значений индекса Ренье.

Производные 1 и 4 обладают значительным местноанестетическим эффектом, зависимым от облучения. Этеркаин с простым эфирным линке-

ром (1) обладает более выраженным местноанестетическим эффектом в *E*-форме, по сравнению с его амидным аналогом (соединение 4) ($p > 0.05$, непарный *t*-тест). Различия в местноанестетическом эффекте соединений 1 и 4 в *Z*-форме являются статистически не значимыми ($p > 0.05$, непарный *t*-тест). Соединение 8 проявляло волнообразный эффект и практически не обладало местноанестетическими свойствами ни в *E*-, ни в *Z*-форме.

С целью уточнения механизма действия соединений 1 и 4 были проведены электрофизиологические исследования *in vitro* на изолированных нейронах мозга крысы («пэтч-кламп»-регистрация трансмембранных токов в режиме фиксации потенциала, конфигурация «целая клетка»). На рис. 3 приведены примеры токов через Na_v -каналы в пирамидных клетках гиппокампа, вызванные короткой ступенькой деполяризации (от -100 мВ до $+20 \text{ мВ}$). При экстраклеточной подаче веществ 1 и 4 амплитуда ответов уменьшалась, в концентрации 100 мкМ оба вещества вы-

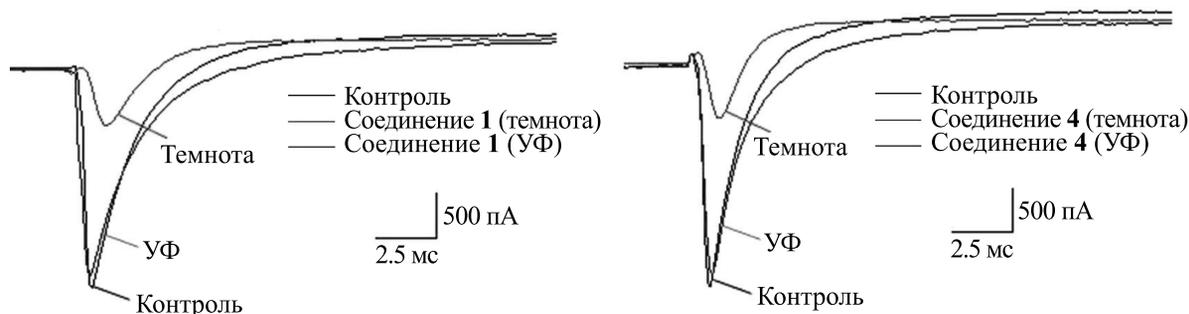


Рис. 3. Действие соединений 1 (а) и 4 (б) в концентрации 100 мкМ на нейрональные Na_v пирамидных клеток гиппокампа (регистрация методом «пэтч-кламп» трансмембранных токов в режиме «целая клетка») в *транс*- (в темноте) и *цис*- (при УФ-облучении) формах. Потенциал фиксации -100 мВ .

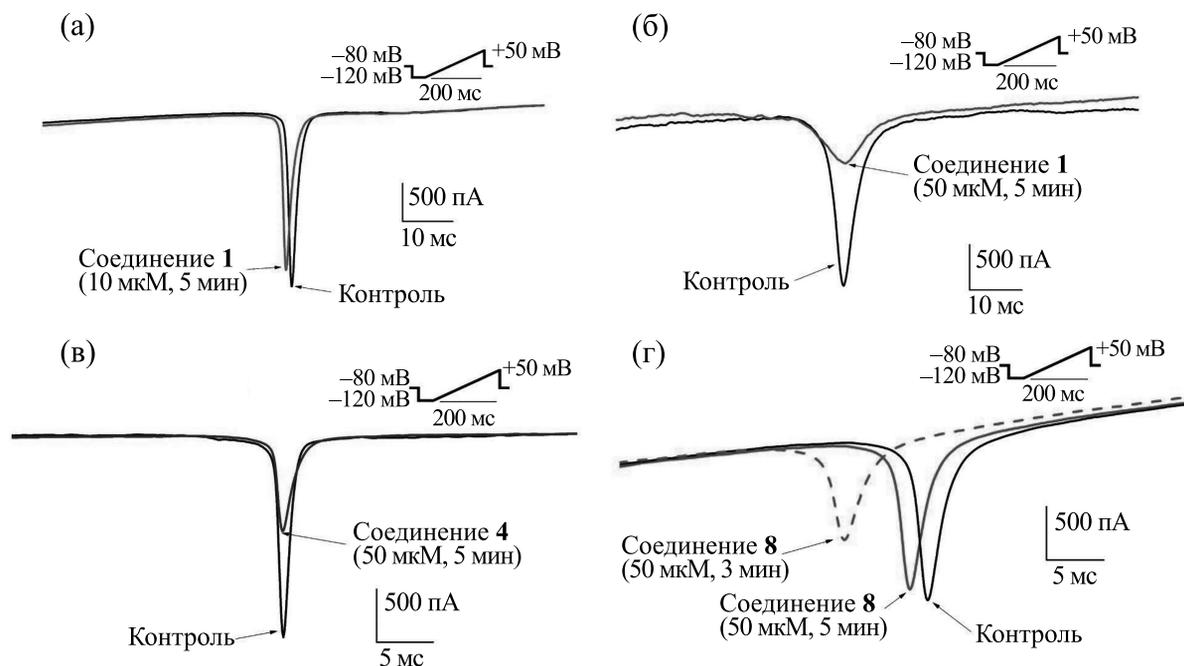


Рис. 4. Быстрый натриевый ток I_{NaV} в неонатальных кардиомиоцитах желудочков крыс в контроле (черная кривая) и под действием исследуемых веществ: (а) – соединение **1** (10 мкМ, через 5 мин), (б) – соединение **1** (50 мкМ, через 5 мин), (в) – соединение **4** (50 мкМ, через 5 мин), (г) – соединение **8** (50 мкМ, через 3 и 5 мин).

зывали глубокое сопоставимое угнетение токов ($I_{drug}/I_{control} = 0.17 \pm 0.07$ ($n = 6$) и $I_{drug}/I_{control} = 0.20 \pm 0.04$ ($n = 5$) соответственно, $p > 0.05$, непарный t -тест). При облучении монохроматическим светом ответ восстанавливался до контрольного уровня. Действие соединений было концентрационно-зависимым, величины IK_{50} в условиях без освещения составляли 38.75 ± 1.16 мкМ и 36.19 ± 1.15 мкМ для соединений **1** и **4** соответственно. В концентрациях выше 100 мкМ при облучении препарата нарушалась стабильность пэтч-кламп регистрации. По этой причине величины IK_{50} при облучении светом определены не были.

Таким образом, соединения **1** и **4** являются антагонистами нейрональных Na_v -каналов в условиях без освещения в микромолярных концентрациях. Кроме того, соединения практически полностью теряют активность при облучении УФ-светом, что свидетельствует о фотопереключаемом действии на ионные каналы.

Исследование антиаритмических свойств производных этеркаина. Следующим этапом работы было исследование антиаритмических свойств соединений **1**, **4** и **8**. Для этого были проведены пилотные серии экспериментов *in vitro* на крысиных кардиомиоцитах с использованием метода «пэтч-кламп» в конфигурации «целая клетка» (рис. 4).

Для исследования токов I_{Na} под действием соединений **1**, **4** и **8** применялся протокол стимуляции Ramp, который представляет собой линейное увеличение потенциала от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс. Сначала регистрировали контрольный I_{NaV} с помощью указанного протокола, а затем инкубировали клетку в растворе с веществом в течение 3 мин, после чего снова записывали I_{NaV} .

Было изучено действие соединения **1** на работу быстрых натриевых каналов в концентрации 10 мкМ, при этом отсутствовало значительное влияние этеркаина на амплитуду I_{NaV} (рис. 4а). В связи с этим в дальнейших экспериментах исследуемые соединения использовали в концентрации 50 мкМ.

После добавления соединения **1** в данной концентрации амплитуда натриевого тока I_{Na} уменьшилась на 70% (рис. 4б). В случае действия *транс*-формы соединения **4** ток I_{Na} уменьшился на 50% (рис. 4в). После добавления *транс*-формы соединения **8** (рис. 4г) наблюдалось уменьшение амплитуды I_{Na} спустя 3 мин после добавления вещества, однако вскоре амплитуда восстановилась практически до контрольного значения.

Таким образом, были записаны токи I_{Na} в контроле и под действием *транс*-формы производных **1**, **4** и **8**. Соединения **1** и **4** в концентрации 50 мкМ значительно уменьшали амплитуду тока

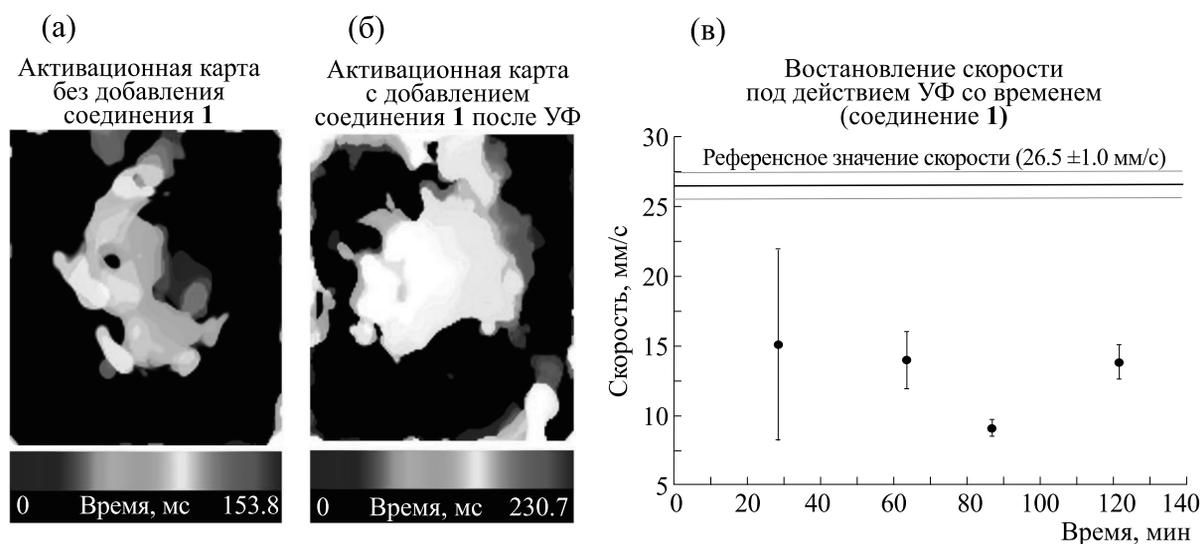


Рис. 5. Скорости проведения волны культурой кардиомиоцитов при добавлении соединения **1** с последующим УФ-облучением. (а) – Активационная карта образца до добавления азобензола (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 153 мс. (б) – Активационная карта образца после воздействия УФ с соединением **1** (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 230 мс. (в) – График зависимости скорости проведения волны возбуждения от времени после воздействия УФ на культуру ткани с добавлением соединения **1**, скорость проведения в мм/с, время – в мин.

I_{Na} , в то время как воздействие соединения **8** на клетку оказалось нестабильным.

Изучение волн возбуждения в культуре ткани при воздействии производных этеркаина. Для изучения управляемых светом антиаритмических свойств соединений **1**, **4** и **8** были проведены исследования методом оптического картирования на монослое желудочковых кардиомиоцитов крысы до и после воздействия ультрафиолетового излучения (365 нм).

Было изучено влияние соединения **1** на образцы проведение волны возбуждения в монослоях крысиных кардиомиоцитов. После добавления соединения **1** в концентрации 50 мкМ без облучения блокировка волны наступала через 20–40 мин после добавления вещества в зависимости от образца ($n = 6$, рис. 5б). Через 5 мин после достижения блокировки волны образец облучали УФ-светом, после чего измеряли скорость волны в культуре. В ходе оптимизации режима облучения было установлено, что для частичного восстановления проводимости необходимо облучение образца УФ-светом длительностью не менее 30 с. С момента облучения УФ началось восстановление скорости проведения в образце наблюдалось не менее чем через 20 ± 3 мин. На рис. 5 представлены примеры активационных карт волнового фронта, демонстрирующие прохождение волны возбуждения по образцу со временем (рис. 5а,б). На активационной карте продемонстрировано, что в контрольном образце волна проходит значительно быстрее, чем в исследуемом образце после облучения УФ-светом.

Контрольное значение скорости волны, измеренное до добавления азобензольного производного, составляло 26.5 ± 0.94 мм/с (рис. 5в). В примере показаны значения скоростей через 60, 90 и 120 мин после добавления соединения **1**. Скорости после УФ-облучения находились в диапазоне от 9 до 15 мм/с, в среднем скорость восстанавливалась на 48% (12.8 ± 2.3 мм/с). Во всех образцах после добавления соединения **1** наблюдалось постепенное снижение темпов восстановления скорости проведения волны возбуждения спустя час после облучения.

Таким образом, соединение **1** не проявляло аритмогенных свойств на протяжении всего эксперимента. После блокировки проводимости облучение образца УФ-светом позволяло вернуть скорость проведения волны возбуждения по образцу до 48% от контрольного значения, что свидетельствует об ухудшении проведения электро-механической волны кардиомиоцитами под действием данного азобензольного производного в течение времени эксперимента.

Далее были проведены аналогичные исследования с соединением **4** на 6 образцах. Время УФ-облучения в случае соединения **4** составило 10 с (подобрано в ходе оптимизации). Полная блокировка волны в кардиомиоцитах во всех образцах наблюдалась через 5–7 мин после добавления соединения **4**. После перевода соединения **4** в цис-форму путем облучения образца УФ-светом восстановление скорости волны проходило медленнее, чем для соединения **1**, и составляло около 30 мин. Измеренная скорость проведения волны после воздействия УФ составила не менее 30% от

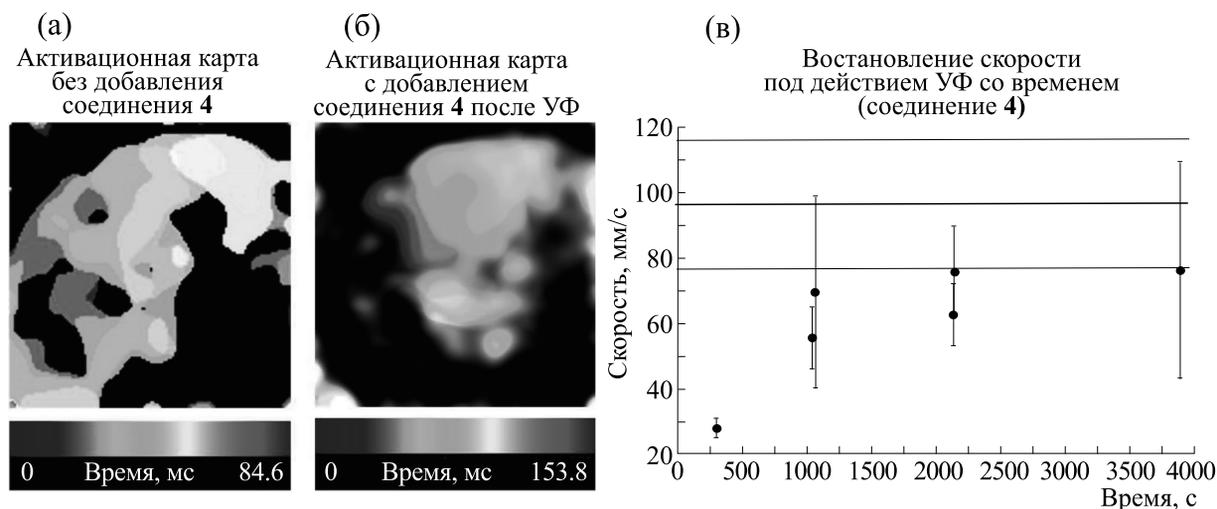


Рис. 6. Скорости проведения волны культурой кардиомиоцитов при добавлении соединения **4** с последующим УФ-облучением. (а) – Активационная карта образца до добавления азобензола (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 84 мс. (б) – Активационная карта образца после воздействия УФ с добавлением соединения **4** (контроль). (в) – График зависимости скорости проведения волны возбуждения от времени после воздействия УФ на культуру ткани с добавлением соединения **4**.

контрольного значения. Максимальное восстановление скорости проведения в измерениях составляло порядка 85% от контрольных значений скорости, что является лучшим результатом среди трех рассмотренных азобензольных производных. Примеры активационных карт и графика восстановления скорости приведены на рис. 6.

Активационные карты (рис. 6а,б) демонстрируют незначительное снижение скорости при восстановлении скорости под действием соединения **4** в *цис*-конформации (после УФ-облучения). Для примера тенденции восстановления был взят образец с контрольной скоростью 97 ± 20 мм/с (рис. 6в). Для него проводили регистрацию скорости проведения волны возбуждения через 20, 30 и 60 мин. Финальное значение восстановления скорости для данного образца составляло 76 ± 14 мм/с.

Соединение **4** не проявляло аритмогенных свойств на протяжении всего эксперимента, что было продемонстрировано на активационных картах. Добавление соединения **4** к культуре кардиомиоцитов приводило к относительно быстрой (5–7 мин) обратимой блокировке проведения волны, при этом скорость постепенно восстанавливается после УФ-облучения и через час составляет около 78% от контрольного значения.

Эксперименты по исследованию скорости проведения волны с соединением **8** были проведены для 4 образцов. После добавления соединения **8** в концентрации 50 мкМ блокировка волны не наблюдалась в течение 30 мин, после чего концентрация вещества была увеличена в два раза. Для частичного восстановления возбуждения в случае соединения **8** потребовалось 30–40 с облу-

чения УФ-светом, что превышало показатели для остальных веществ. После УФ-облучения во всех образцах наблюдались реентри, выявлялись неоднородности в культуре кардиомиоцитов, на которых возникали устойчивые спиральные волны (рис. 7б). При этом в контроле у этих образцов фронт волны неразрывен (рис. 7а). Примеры активационных карт и возникновения реентри на образцах с добавлением соединения **8** представлены на рис. 7.

В части образцов через 30 мин после блокировки волны возбуждения и последующего облучения УФ-светом не происходило восстановления проведения волны возбуждения.

Таким образом, соединение **8** показало сильные аритмогенные свойства, по-видимому, за счет действия на межклеточные связи.

Сравнение соединений **1**, **4** и **8** на основе азобензола показало, что соединение **4** характеризуется большей скоростью проведения волны возбуждения после УФ-облучения по сравнению с соединением **1** (85 и 48% от контрольных значений соответственно), а соединение **8** проявляет аритмогенные свойства и с течением времени блокирует проведение волны в *цис*- и *транс*-формах.

ВЫВОДЫ

В рамках данной работы впервые были получены два новых производных местного анестетика этеркаина и исследованы их местноанестетическая и антиаритмическая активности. Методом «пэтч-кламп» на нативных крысиных кардиомиоцитах и нейронах головного мозга впервые показано, что этеркаин и его производные являются блокаторами

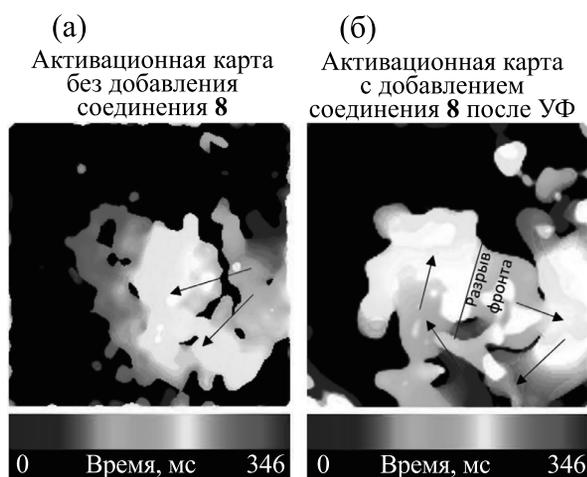


Рис. 7. Активационные карты проведения фронта волны в образце крысиных кардиомиоцитов: (а) – до добавления соединения **8**, (б) – после добавления вещества соединения **8**. Черными стрелками показано направление движения фронта волны во времени.

потенциал-зависимых натриевых каналов. Амидный аналог этеркаина обладает местноанестетическим эффектом *in vivo* на модели поверхностной анестезии, сравнимым с действием исходного этеркаина, что согласуется с результатами исследования данных соединений *in vitro* на нейронах крыс. Модификация этеркаина путем введения в структуру последнего карбоксильной группы в 4'-положение азобензола привела к практически полной потере местноанестетической активности *in vivo*, а также к появлению артимогенных свойств на культурах кардиомиоцитов.

Как этеркаин, так и его амидное производное способны обратимо блокировать проводимость волны возбуждения в культурах крысиных кардиомиоцитов, однако для амидного производного характерно более быстрое блокирование и более полное восстановление скорости волны возбуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Химический синтез был выполнен при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ГЗ № 075-00701-24-07 от 03.04.2024; FSFZ-2024-0013). Биологические исследования с использованием нейронов выполнены при поддержке гос. задания ИЭФБ РАН (ГЗ № 075-00264-24-00). Физико-химические исследования полученных соединений были выполнены с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-689 от 01.09.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных с использованием нейронов головного мозга проводили в соответствии с нормами биоэтики по протоколам, утвержденным комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол #1-19/2023). Проведенные эксперименты с использованием кардиомиоцитов соответствуют «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных» (№ 85-23, редакция 1996 года) и одобрены Комитетом по наблюдению за животными и исследованиям МФТИ (протокол № А2-2012-09-02). Все манипуляции с животными, связанные с исследованием местноанестетической активности на кроликах, одобрены Биоэтическим комитетом МНИОИ им. П.А.Герцена (протокол № 32 от 22.12.2022) и выполнены в соответствии с национальными и международными правилами гуманного обращения с животными (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Council of Europe (ETS 123), Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC 2011)) [24].

ПРИЛОЖЕНИЕ

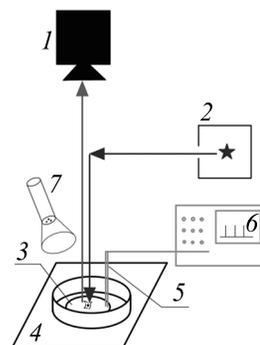


Рис. S1. Схема установки для оптического картирования: 1 – камера, 2 – ртутная лампа, 3 – образец, 4 – thermoplate, 5 – электроды, 6 – вид подаваемого импульса, 7 – УФ-диод.

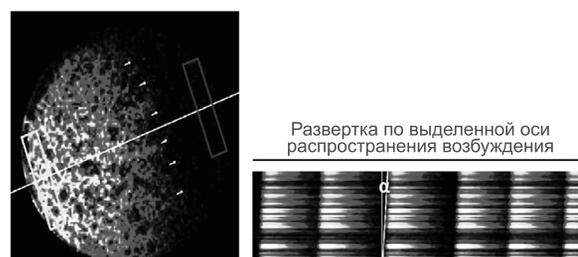


Рис. S2. Иллюстрация пространственно-временной развертки для определения скорости волны возбуждения по образцу монослоя.

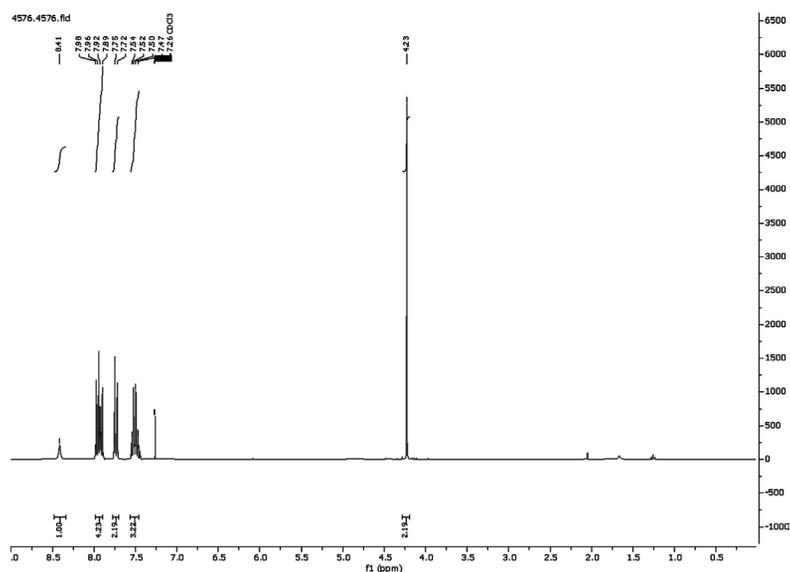


Рис. S3. ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) спектр соединения 3.

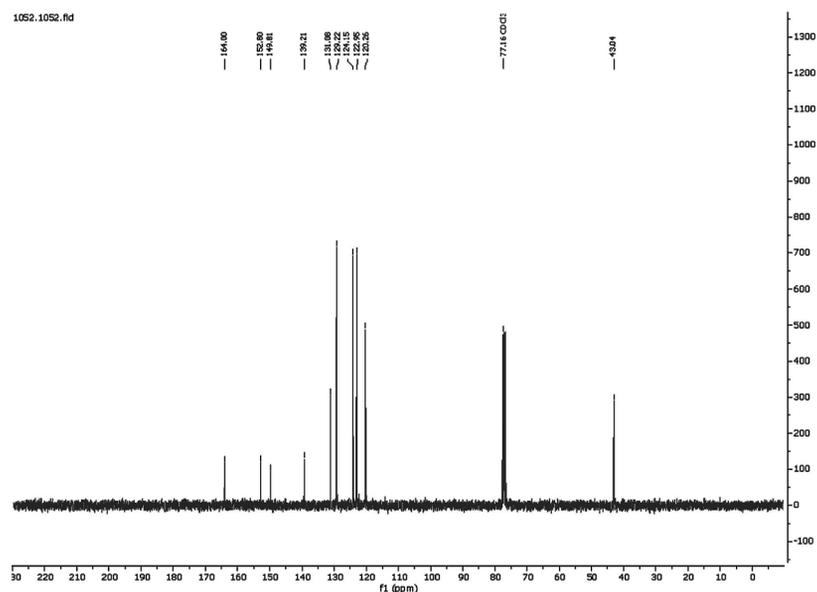


Рис. S4. ¹³C-ЯМР спектр (300 МГц, CDCl₃) соединения 3.

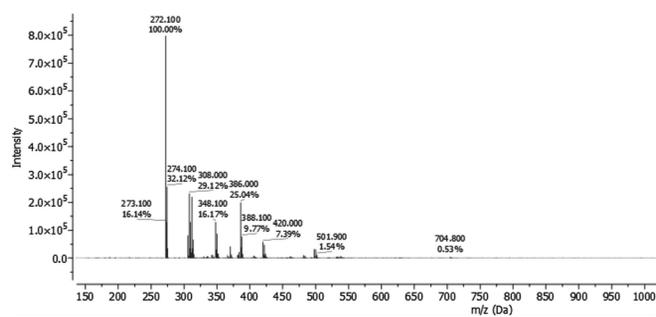


Рис. S5. Масс-спектр ESI⁻ соединения 3.

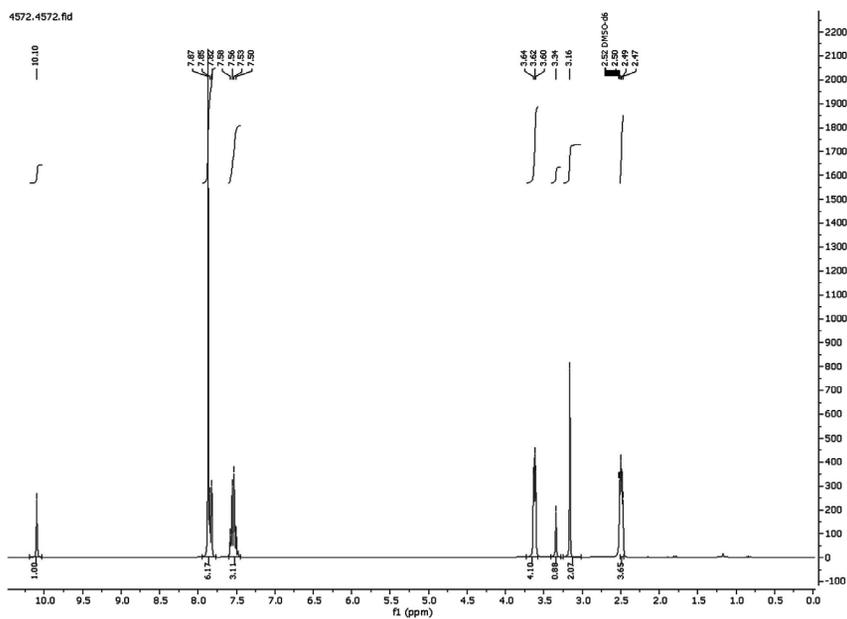


Рис. S6. ^1H -ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) спектр соединения **4a**.

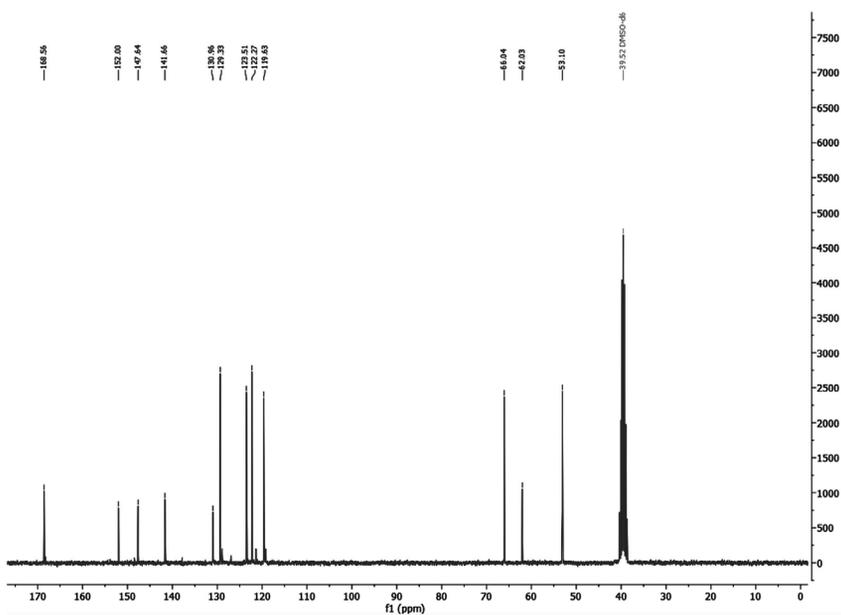


Рис. S7. Спектр ^{13}C -ЯМР (75 МГц, ДМСО- d_6) соединения **4a**.

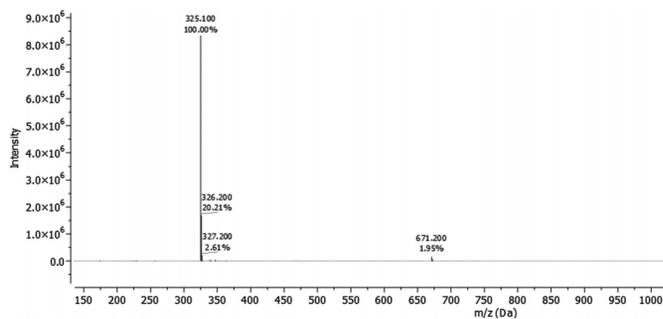


Рис. S8. Масс-спектр ESI^+ соединения **4a**.

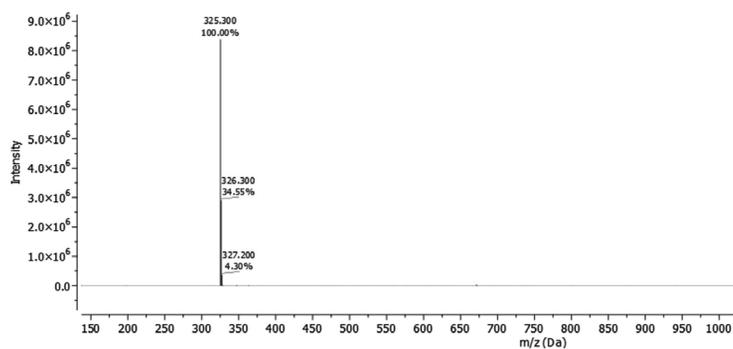


Рис. S9. Масс-спектр ESI⁺ соединения 4.

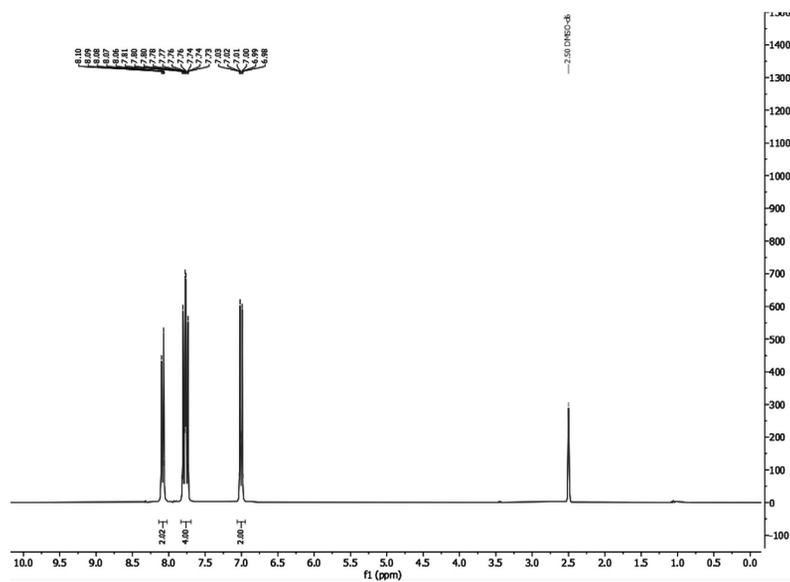


Рис. S10. ¹H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆) соединения 6.

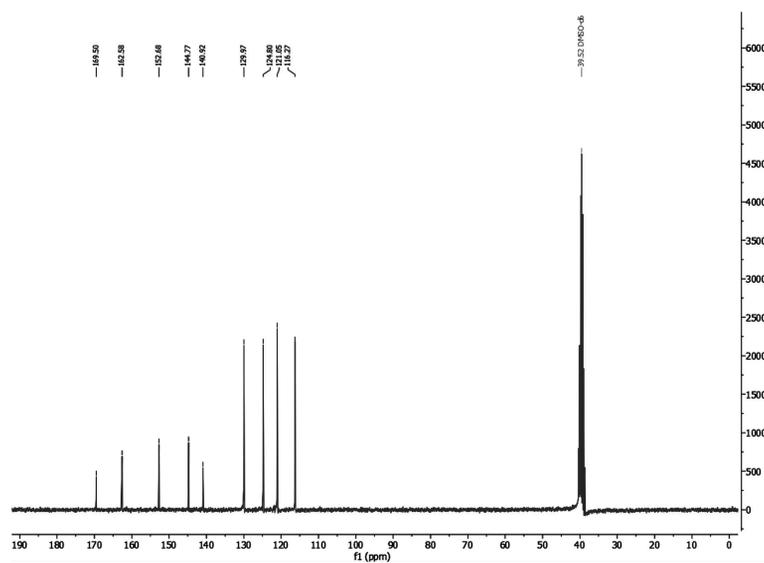
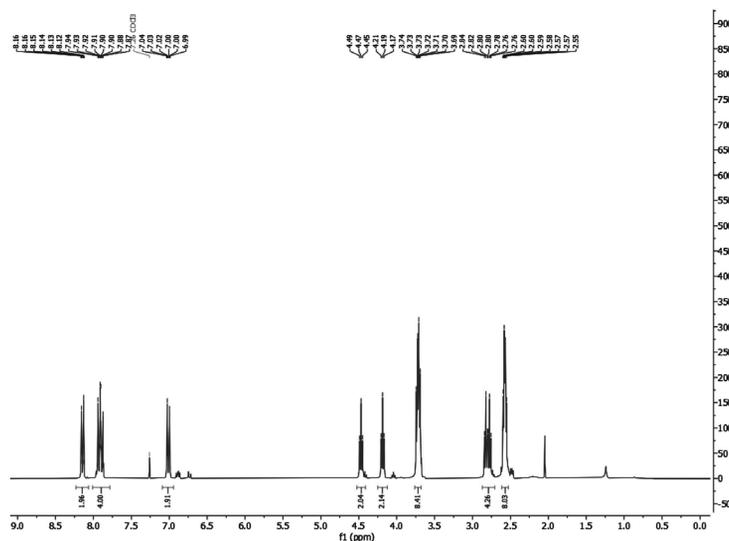
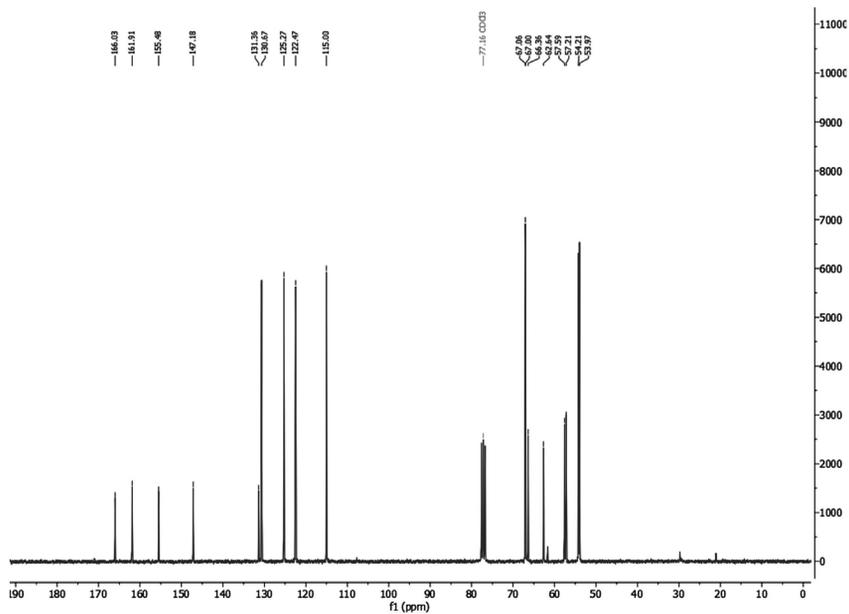
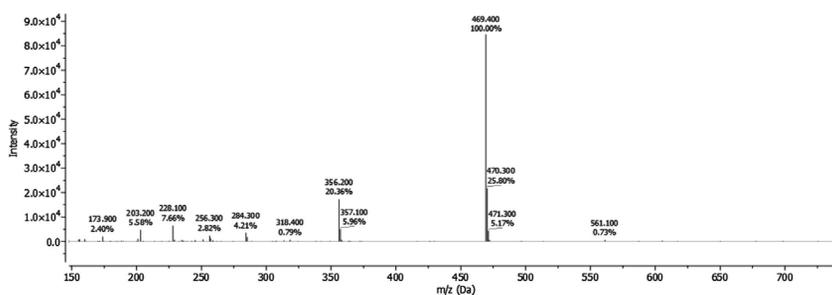


Рис. S11. ¹³C-ЯМР спектр (75 МГц, ДМСО-d₆) соединения 6.

Рис. S12. ^1H -ЯМР спектр (300 МГц, хлороформ- d_6) соединения 7.Рис. S13. ^{13}C -ЯМР спектр (75 МГц, хлороформ- d_6) соединения 7.Рис. S14. Масс-спектр ESI^+ соединения 7.

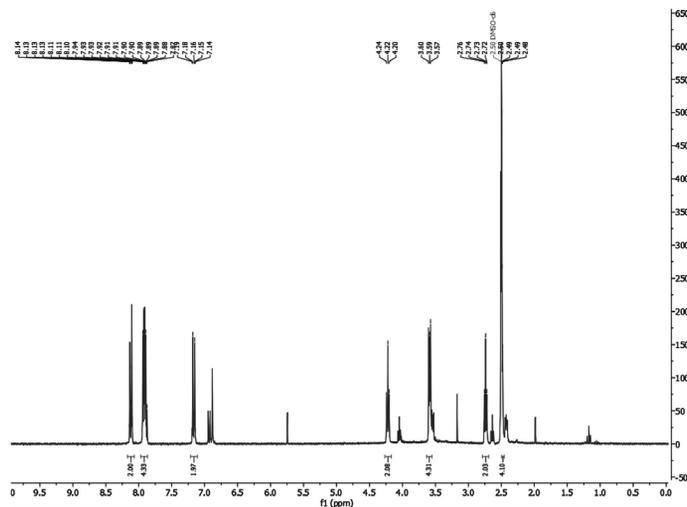


Рис. S15. ¹H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆) соединения 8.

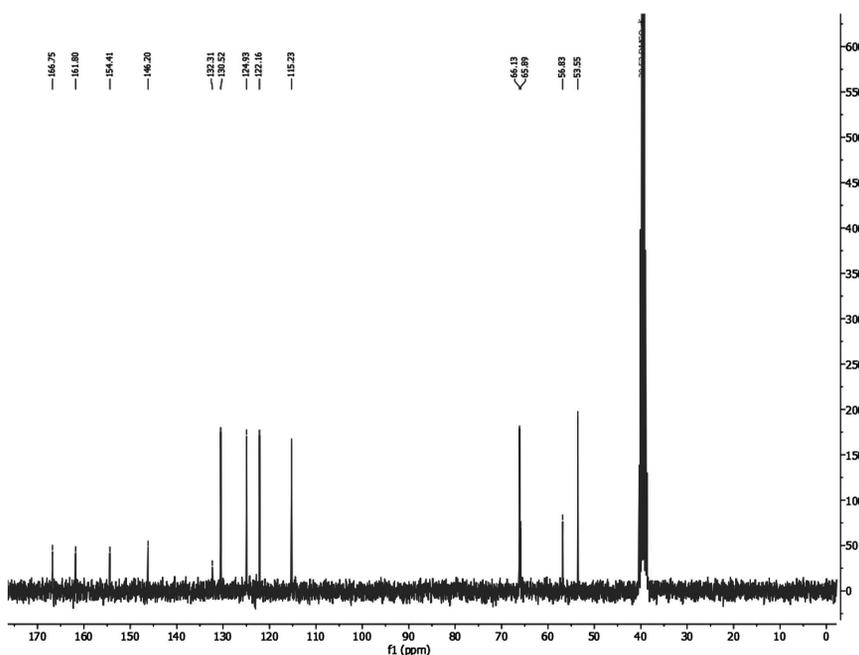


Рис. S16. ¹³C-ЯМР спектр (75 МГц, ДМСО-d₆) соединения 8.

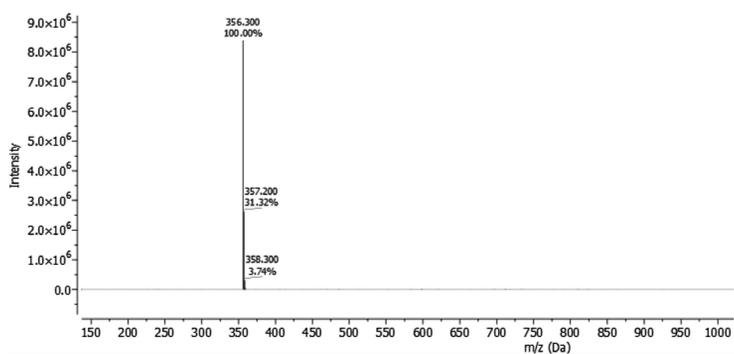


Рис. S17. Масс-спектр ESI⁺ соединения 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grant A. O. Sodium Channel Blockade as an Antiarrhythmic Mechanism. In *Antiarrhythmic Drugs: Mechanisms of Antiarrhythmic and Proarrhythmic Actions*, Ed. by G. Breithardt, M. Borggrefe, A. J. Camm, and M. Shenasa (Springer, Berlin–Heidelberg, 1995), pp. 3–22. DOI: 10.1007/978-3-642-85624-2_1
2. Roden D. M. Pharmacology and toxicology of Na_v1.5-Class 1 antiarrhythmic drugs. *Card. Electrophysiol. Clin.*, **6** (4), 695–704 (2014). DOI: 10.1016/j.ccep.2014.07.003
3. Lagan G. and McLure H. A. Review of local anaesthetic agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, **15** (4–5), 247–254 (2004). DOI: 10.1016/j.cacc.2004.08.007
4. Tikhonov D. B. and Zhorov B. S. Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *J. Gen. Physiol.*, **149** (4), 465–481 (2017). DOI: 10.1085/jgp.201611668
5. Fozzard H. A., Sheets M. F., and Hanck D. A. The sodium channel as a target for local anesthetic drugs. *Front. Pharmacol.*, **2**, 1–6 (2011). DOI: 10.3389/fphar.2011.00068
6. Arumugam S., Contino V., and Kolli S. Local anesthetic systemic toxicity (LAST) – a review and update. *Curr. Anesthesiol. Rep.*, **10** (2), 218–226 (2020). DOI: 10.1007/s40140-020-00381-x
7. Gitman M. and Barrington M. J. Local Anesthetic Systemic Toxicity: A Review of Recent Case Reports and Registries. *Reg. Anesth. Pain Med.*, **43** (2), 1 (2018). DOI: 10.1097/AAP.0000000000000721
8. Zhang W., Ji T., Li Y., Zheng Y., Mehta M., Zhao C., Liu A., and Kohane D. S. Light-triggered release of conventional local anesthetics from a macromolecular prodrug for on-demand local anesthesia. *Nat. Commun.*, **11** (1), 2323 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-16177-w
9. Moradkhani M. R., Karimi A., and Negahdari B. Nanotechnology application to local anaesthesia. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, **46** (2), 355–360 (2018). DOI: 10.1080/21691401.2017.1313263
10. Fuchter M. J. On the promise of photopharmacology using photoswitches: a medicinal chemist's perspective. *J. Med. Chem.*, **63** (20), 11436–11447 (2020). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00629
11. Velema V. A., Szymanski W., and Feringa B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (6), 2178–2191 (2014). DOI: 10.1021/ja413063e
12. Rozhkov K. I., Yagudaeva E. Y., Sizova S. V., Lazov M. A., Smirnova E. V., Zubov V. P., and Ischenko A. A. Characterization of iron-doped crystalline silicon nanoparticles and their modification with citrate anions for in vivo applications. *Fine Chem. Technol.*, **16** (5), 414–425 (2021). DOI: 10.32362/2410-6593-2021-16-5-414-425
13. Broichhagen J., Frank J. A., and Trauner D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc. Chem. Res.*, **48** (7), 1947–1960 (2015). DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00129
14. Noev A., Kuznetsov N., Korenev G., Morozova N., Vasil'ev Y., Suvorov N., Diachkova E., Usachev M., Pankratov A., and Grin M. A Novel Photoswitchable Azobenzene-Containing Local Anesthetic Ethercaine with Light-Controlled Biological Activity In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (10), 5352 (2022). DOI: 10.3390/ijms23105352
15. Noev A., Morozova N., Suvorov N., Vasil'ev Y., Pankratov A., and Grin M. Development of a Dosage form for a Photoswitchable Local Anesthetic Ethercaine. *Pharmaceuticals*, **16** (10), 1398 (2023). DOI: 10.3390/ph16101398
16. Gazerani P. Shedding light on photo-switchable analgesics for pain. *Pain Manag.*, **7** (2), 71–74 (2017). DOI: 10.2217/pmt-2016-0039
17. Frolova S. R., Gaiko O., Tselaya V. A., Pimenov O. Y., and Agladze K. I. Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *PLoS One*, **11** (3), e0152018 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0152018
18. Nizamieva A. A., Kalita I. Y., Slotvitsky M. M., Berezhnoy A. K., Shubina N. S., Frolova S. R., Tselaya V. A., and Agladze K. I. Conduction of excitation waves and reentry drift on cardiac tissue with simulated photocontrol-varied excitability. *Chaos*, **33**(2), (2023). DOI: 10.1063/5.0122273
19. Frolova S. R., Gorbunov V. S., Shubina N. S., Perepukhov A. M., Romanova S. G., and Agladze K. I. Stilbene derivative as a photosensitive compound to control the excitability of neonatal rat cardiomyocytes. *Biosci. Rep.*, **39** (1), 1–14 (2019). DOI: 10.1042/BSR20181849
20. Mourot A., Fehrentz T., Le Feuvre Y., Smith C. M., Herold C., Dalkara D., Nagy F., Trauner D., and Kramer R. H. Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nat. Methods*, **9** (4), 396–402 (2012). DOI: 10.1038/nmeth.1897
21. Mourot A., Herold C., Kienzler M. A., and Kramer R. H. Understanding and improving photocontrol of ion channels in nociceptors with azobenzene photo-switches. *Br. J. Pharmacol.*, **175** (12), 2296–2311 (2018). DOI: 10.1111/bph.13923
22. Fehrentz T., Kuttruff C. A., Huber F. M. E., Kienzler M. A., Mayer P., and Trauner D. Exploring the Pharmacology and Action Spectra of Photochromic Open-Channel Blockers. *ChemBioChem*, **13** (12), 1746–1749 (2012). DOI: 10.1002/cbic.201200216
23. Schoenberger M., Damijonaitis A., Zhang Z., Nagel D., and Trauner D. Development of a New Photochromic Ion Channel Blocker via Azologization of Fomocaine. *ACS Chem. Neurosci.*, **5** (7), 514–518 (2014). DOI: 10.1021/cn500070w
24. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Washington (National Academies Press, 2011). DOI: 10.17226/12910

Azobenzene-Based Voltage-Gated Sodium Channel Blockers with Light-Controlled Local Anesthetic and Antiarrhythmic Activity

A.N. Noev^{*}, S.G. Kovalenko^{***}, E.D. Gataulina^{*****}, E.A. Turchaninova^{***},
V.D. Dzhabrailov^{***}, A.A. Aitova^{***}, D.A. Likhobabina^{*}, J.A. Sutemieva^{*},
S.R. Frolova^{***}, L.E. Ruppel^{***}, D.A. Minakov^{*}, N.V. Suvorov^{*}, P.V. Ostroverkhov^{*},
Yu.L. Vasil'ev^{*****}, M.V. Nikolaev^{*****}, V.A. Tsvelaya^{***}, K.I. Agladze^{***}, and M.A. Grin^{*}

^{*}MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

^{**}P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2nd Botkinsky pr. 3, 125284 Moscow, Russia

^{***}Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

^{****}M.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute, ul. Schepkina 61/2, Moscow, 129110 Russia

^{*****}I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Thoreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

^{*****}I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119048 Russia

^{*****}ITMO University, Kronverksky prosp. 49A, St. Petersburg, 197101 Russia

The work is devoted to the synthesis of new light-controlled voltage-gated sodium (Na_v) channel blockers based on azobenzene and the study of their local anesthetic and antiarrhythmic properties. The effect of ethercaine and two of its new derivatives on native Na_v channels was studied *in vitro* using the patch-clamp method on isolated excitable cells (neurons and cardiomyocytes) of a rat, and local anesthetic activity of the compounds was evaluated on rabbit's eye cornea. Studies of the effect of the obtained compounds on the conductivity of excitation waves in cardiomyocyte cultures using the optical mapping method were performed. The effective light-dependent biological activity of ethercaine and its derivatives allows us to consider the resulting compounds as potential tools for light-controlled local anesthesia, as well as for non-invasive ablation of arrhythmia in the heart in cardiology.

Keywords: photopharmacology, Na_v channel blockers, azobenzenes, local anesthetics, antiarrhythmics

УНИКАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ГРИБА *Mycena gombakensis*

© 2024 г. А.П. Пузырь^{*,#}, Е.Д. Посохина^{*}, А.А. Тимофеев^{**,*}, А.Е. Буров^{*,****},
С.Е. Медведева^{*}, И.Н. Павлов^{**,*}, *****

^{*}Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

^{**}Институт леса СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036, Россия

^{***}Лаборатория геномных исследований и биотехнологии ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50, Красноярск, 660036, Россия

^{****}Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, просп. Академика Лаврентьева, 6, Новосибирск, 630090, Россия

^{*****}Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, просп. им. газеты Красноярский рабочий, 31, Красноярск, 660037, Россия

[#]E-mail: apuzyr@mail.ru

Поступила в редакцию 12.01.2024 г.

После доработки 05.05.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Представлены результаты исследований люминесцентной системы культуры гриба *Mycena gombakensis*, выделенной из образцов древесины. Описаны изменения, произошедшие за 10 лет хранения образцов в нестерильных условиях, и динамика люминесцентных сигналов. Методом филогенетического анализа выполнена видовая идентификация гриба. Представлен ряд уникальных особенностей *M. gombakensis*, расширяющих представления о свойствах люминесцентных грибов. Данные исследований свидетельствуют о перспективности использования *M. gombakensis* как в биотехнологии, так и в изучении биофизики сложной системы базидиомицетов.

Ключевые слова: биолюминесценция базидиомицетов, *Mycena gombakensis*, мицелиальная культура, видовая идентификация.

DOI: 10.31857/S0006302924030154, EDN: OEUFUW

При изучении биолюминесценции грибов для получения мицелиальной культуры можно использовать не только плодовые тела, но и образцы люминесцирующей древесины или листового опада [1, 2]. В результате экспедиции на остров Борнео в 2013 г. в кокосовой роще были обнаружены образцы светящейся древесины. Из этих образцов была выделена мицелиальная культура, обладающая люминесценцией. Выделенную культуру внесли в перечень Коллекции культур Института биофизики СО РАН под номером 2371 [3]. Оказалось, что образцы светящейся древесины через 31 месяц хранения в нестерильных условиях сохраняют люминесценцию и не зарастают посторонней микрофлорой [4].

В данной статье описаны изменения, произошедшие с образцами древесины в результате 10

лет хранения в нестерильных условиях и результат определения вида данного гриба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее время образцы древесины хранятся в пластиковых тубах (Tissue culture flat tubes 10, Швейцария) и пластиковой колбе (Tissue culture flask 3 pcs, 150 см³, Швейцария), помещенных в термостат при температуре 27°C (ТСО-1/80, СПУ, Россия). С некоторой периодичностью образцы извлекаются из термостата для регистрации люминесценции и добавления в нестерильных условиях нестерильной воды с целью поддержания влажности. Для визуализации люминесценции мицелия на древесине используется гель-документирующая система (GelDoc XR Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Данный прибор позволяет получить изображение

Сокращение: УФ – ультрафиолетовый.

образцов при наличии света и регистрировать люминесценцию в отсутствие освещения.

Рост мицелия культуры 2371 для исследования люминесценции проводится на твердой и жидкой питательных средах. Для выращивания на твердой питательной среде применяется картофельно-сахарозная среда с добавлением агар (картофельный отвар 200 г/л, сахароза 20 г/л, агар 20 г/л). Культивирование проводится в 35 мм чашках Петри при температуре 27°C. Мицелий, полученный на твердой питательной среде, является инокулятом при посеве на жидкую питательную картофельно-сахарозную среду (картофельный отвар 200 г/л, сахароза 20 г/л). Культивирование проводится в объеме или на поверхности жидкой питательной среды при температуре 27°C. Культивирование в жидкой питательной среде проводится в 300 мл колбах Эрленмейера, содержащих 150 мл питательной среды в шейкер-инкубаторе (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Латвия) с постоянным перемешиванием при 160 об/мин. Культивирование на поверхности жидкой питательной среды – в 35 мм чашках Петри без перемешивания.

Из мицелия, выросшего на поверхности или в жидкой питательной среде, были выделены ферментные люминесцентные системы. Методика выделения подробно описана в работе [3]. Лиофильно высушенные ферментные системы хранятся при температуре –40°C. В настоящее время отличительной особенностью измерения люминесценции в реакции *in vitro* является уменьшение объема ферментной системы со 100 до 50 мкл, а в качестве субстрата люминесцентной реакции используется горячий экстракт из плодовых тел *Pholiota squarrosa*. Интенсивность люминесцентного сигнала регистрируется люминометром со спектральным диапазоном 350–650 нм (Glomax 20/20, Promega, США).

Интенсивность люминесценции мицелия изменяют внешние факторы, к которым можно отнести механическое раздражение и немеханическое воздействие. Аналогом близкого к природному немеханическому внешнему воздействию на мицелий гриба можно считать ультрафиолетовое облучение. Облучение в течение 30 с проводили с использованием ультрафиолетового фонарика с длиной волны 367 нм. Изменение интенсивности люминесценции регистрировали на гелъдокументирующей системе и люминометре Glomax 20/20.

Для определения видовой принадлежности культуры 2371 был получен мицелий на твердой и в жидкой питательных средах и передан в ИЛ СО РАН. Для выделения ДНК мицелий, культивируемый в течение 14 суток на агаровой пластине среды МЭА, предварительно замораживали и помещали в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

В каждую пробирку добавляли по 600 мкл буфера ЦТАБ (СТАВ-Lysis buffer, BioChemia, Германия), инкубировали образцы при 65°C в течение 40 мин и центрифугировали 7 мин при 13 000 об/мин. Супернатант последовательно экстрагировали равным объемом хлороформа, осаждали двумя объемами 2-пропанола, промывали 70% этанолом, сушили и повторно растворяли в 80 мкл бидистиллированной воды [5]

Концентрацию ДНК в отдельных образцах определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США). Внутренний транскрибируемый спейсер рибосомальной РНК грибов (ITS рРНК) амплифицировали методом ПЦР с использованием специфического праймера ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) [6] и универсального праймера ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [7]. Последовательность гена фактора элонгации 1 α амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров EF1aF (TCAACGTGGTTCGGTGAGCAGGTA) и EF1aR (AAGTCACGATGTCCAGGAGCATC) [8]. Для секвенирования использовали ДНК-анализатор Honor 1616 (Nanjing Superyears Gene Technology Co., Ltd., Китай).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогенетический анализ для видовой идентификации. Реконструкция филогенетического дерева выполнена на основе метода агломеративной иерархической кластеризации UPGMA. Последовательности были отредактированы и собраны в среде MEGA X [9]. Полученные последовательности сравнивались с последовательностями в GenBank, загружены и выровнены с использованием инструмента MUSCLE Alignment с настройками параметров по умолчанию. Финальное филогенетическое дерево было укорочено с использованием последовательностей *Psathyrella griseovelata* G. Munoz, Musumeci, Deschuyteneer & Olariaga для гена TEF1 α и *Collybiopsis istanbulensis* (E. Sesli, Antonín & K.W. Hughes), J.S. Kim & Y.W. Lim для гена ITS. Анализ максимального правдоподобия был проведен в MEGA X с 1000 Ultrafast Bootstrap. Переходная модель с одинаковой частотой (TN93+G) для ITS и (K2+I) для TEF1 α была выбрана автоматически в качестве наилучшей модели замещения в соответствии с баллом BIC. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Таджима-Ней [10] и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1 и 2.

Люминесценция мицелия *Mycena gombakensis* на образцах древесины. Изменения, происходившие в течение первых 2.5 лет хранения образцов древесины, описаны ранее [4]. В настоящее время

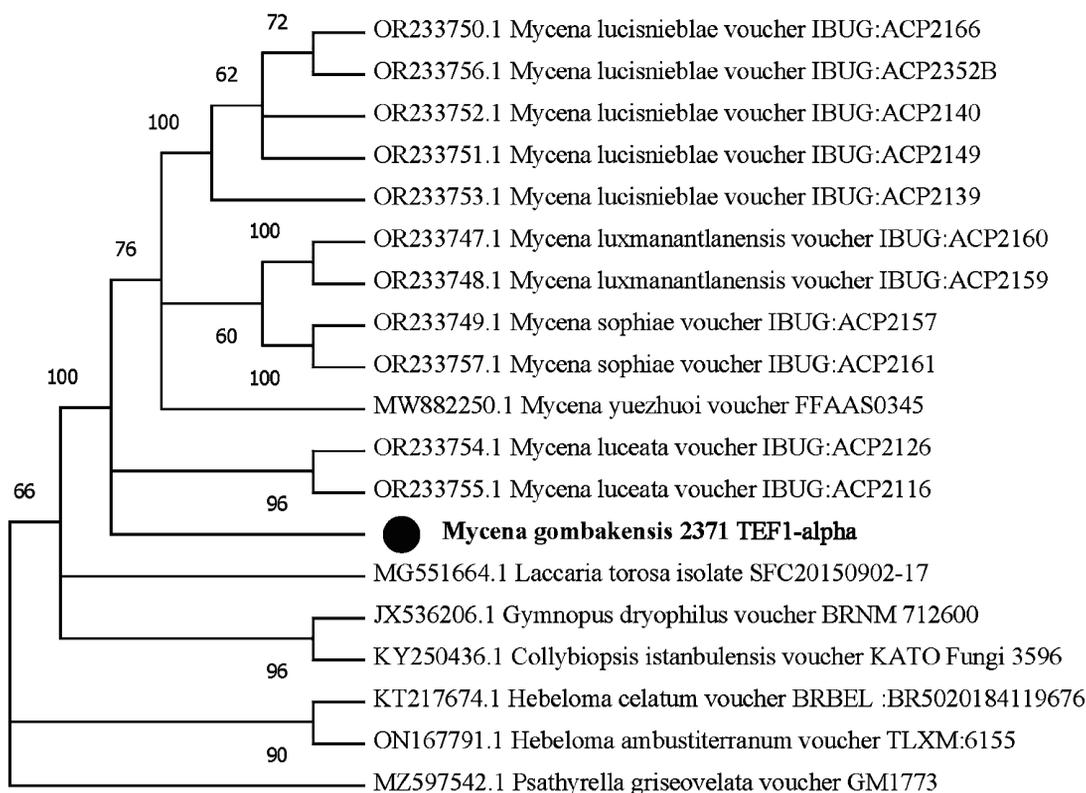


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе метода максимального правдоподобия для культуры 2371 и последовательностей *Mycena* sp. из NCBI GenBank с использованием праймеров TEF-1 α . Бутстреп-значения более 50% указаны рядом с кластерами. В качестве внешней группы использовали *Psathyrella griseovelata*.

регистрируется только рост мицелия гриба (рис. 3).

После 10 лет хранения образцы древесины, к которым с целью поддержания влажности добавляли только воду, сохранили способность мицелия к люминесценции. Однако ее относительно низкий уровень регистрируется только люминометром. Регистрация на гель-документирующей системе возможна только после воздействия внешних факторов – механического (рис. 3 и 4) или в результате облучения ультрафиолетом (рис. 5 и 6).

Выделение ферментной системы из мицелия гриба *Mycena gombakensis*. В зависимости от условий культивирования на поверхности или в объеме жидкой питательной среды из мицелия гриба *M. gombakensis* можно получить две различающиеся ферментные системы для проведения исследований *in vitro*. Ферментная система, полученная из мицелия, выросшего на поверхности питательной среды, содержит собственный субстрат ферментативной реакции. В отличие от нее, ферментная система, полученная из мицелия, выросшего в объеме жидкой питательной среды (в режиме погруженной культуры), не содержит собственного субстрата реакции (рис. 7).

В процессе регистрации люминесценции *in vitro* при комнатной температуре ферменты длительное время сохраняют свою активность. Результаты регистрации в течение 2.5 ч представлены на рис. 8.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования филогении изучаемой культуры для видовой идентификации было показано, что маркерная последовательность TEF1 α культуры 2371, несмотря на размещение в общей кладе рода *Mycena*, стоит несколько обособленно (рис. 1). Однако при включении в исследование гена ITS выявлено большое сходство с видом *Mycena gombakensis* (рис. 2). Маркерные последовательности ITS высоко вариабельны и позволяют легко отличать близкородственные организмы. Данные последовательности являются некодирующими, следовательно, менее подвержены давлению отбора, что очень важно для филогенетических исследований. Последовательности *M. gombakensis* весьма ограничено представлены в GenBank (National Center for Biotechnology Information, США) (TEF1 α отсутствует). Поэтому можно с уверенностью на основании анализа

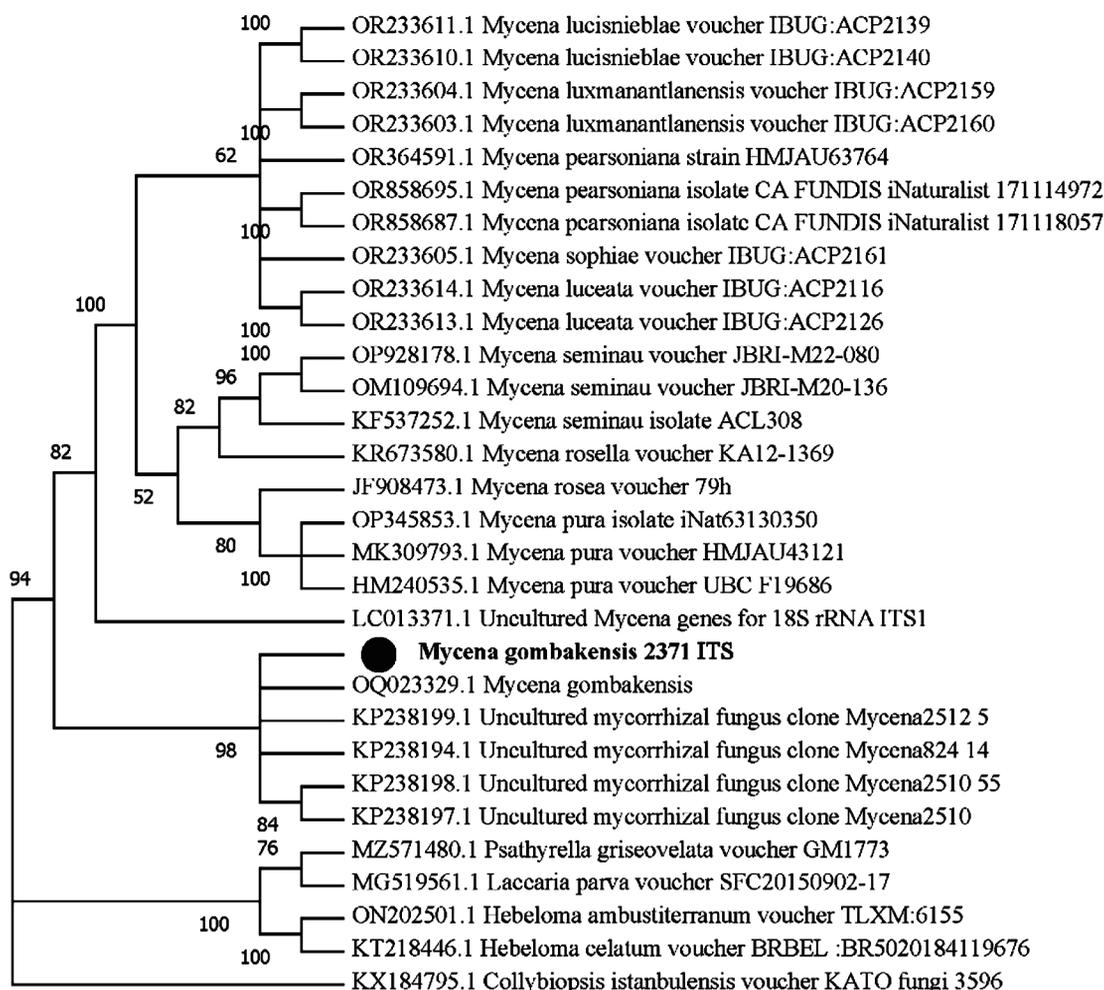


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе метода максимального правдоподобия для культуры 2371 и последовательностей *Mycena* sp. из NCBI GenBank с использованием праймеров ITS. Бутстреп-значения более 50% указаны рядом с кластерами. В качестве внешней группы использовали *Collybiopsis istanbulensis*.

маркерной последовательности ITS говорить о принадлежности штамма 2371 к *M. gombakensis*.

Основной и уникальной особенностью образцов древесины, зараженных мицелием *M. gombakensis*, является способность в течение длительного срока в нестерильных условиях сохранять люминесценцию и не зарастать посторонней микрофлорой. Без этой особенности было бы невозможно получить результаты, отраженные в данной статье. В качестве примера можно привести сравнение с растущим в наших лесах люминесцентным грибом *Armillaria borealis*. Образцы древесины со светящимся мицелием *A. borealis* после сбора в течение нескольких суток зарастают сторонней микрофлорой и теряют способность к люминесценции. Известно, что грибы способны синтезировать и экскретировать в окружающую среду широкий спектр веществ. Ве-

роятно, мицелий *M. gombakensis* выделяет метаболиты, обладающие антимикробным действием.

В данных экспериментах механическое воздействие на образцы древесины было достигнуто путем встряхивания туб с образцами. Интенсивность света достаточно высока, что позволяет его визуализацию на гель-документирующей системе. На рис. 4 видно, что свет излучается с отдельных периферических участков образцов древесины, контактирующих с внутренней поверхностью туба. Центральная часть образцов, которая не испытала контакта с поверхностью туба и не подверглась механическому воздействию, остается темной и свет не излучает. Это позволяет сделать предположение, что метаболизм мицелия гриба при отсутствии и воздействии внешнего механического раздражения различается. Если интенсивность люминесценции является показателем уровня биохимических процессов, то высокий

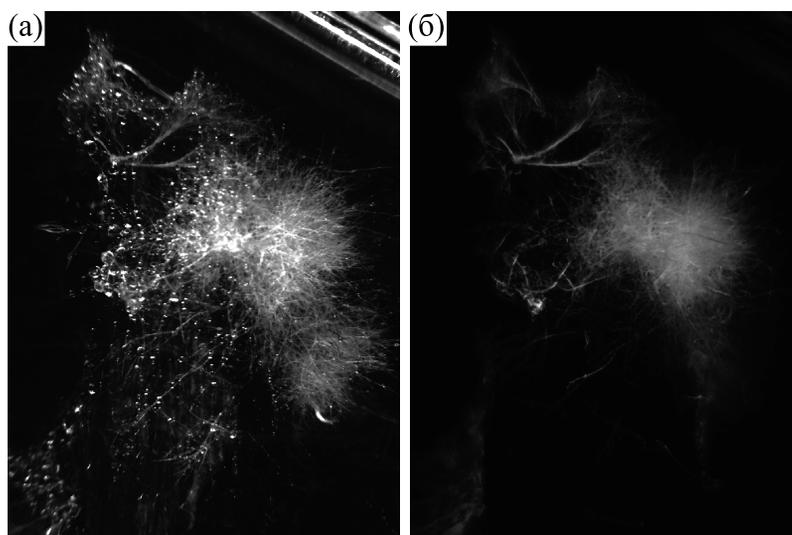


Рис. 3. (а) – Внешний вид мицелия, выросшего на образце древесины, через 10 лет хранения. (б) – Люминесценция мицелия в темноте, вызванная механическим раздражением при транспортировке образца из термостата хранения до системы визуализации.

уровень люминесценции означает интенсивное протекание биохимических реакций, а ее снижение или отсутствие, вероятно, может означать состояние анабиоза. Можно предположить, что низкий уровень биохимических процессов, в котором длительное время находится мицелий гриба в образцах древесины, является причиной сохранения морфологии древесины в течение 10 лет хранения.

Внешним фактором, вызывающим увеличение люминесценции мицелия на образцах древесины, является ультрафиолетовый (УФ) свет. В экспериментальных условиях при визуализации на гель-документирующей системе после облучения максимум интенсивности люминесценции

наблюдается через 10 мин, а затем в течение 25 мин происходит ее постепенное затухание.

Данные по влиянию УФ-света приведены на рис. 5. Перед облучением образца древесины его верхняя часть была закрыта алюминиевой фольгой (рис. 5а). Фольга не пропускает УФ-свет, поэтому облучению подвергалась только нижняя область образца (рис. 5а,б). После удаления фольги и регистрации изображения весь образец подвергался повторному облучению УФ-светом (рис. 5в,г). Данный подход позволяет при визуализации сравнить люминесценцию облученного и необлученного УФ-светом участков образца древесины. На рис. 5б видно, что мицелий облученного участка образца ярко люминесцирует. Световой сигнал на необлученном УФ-светом

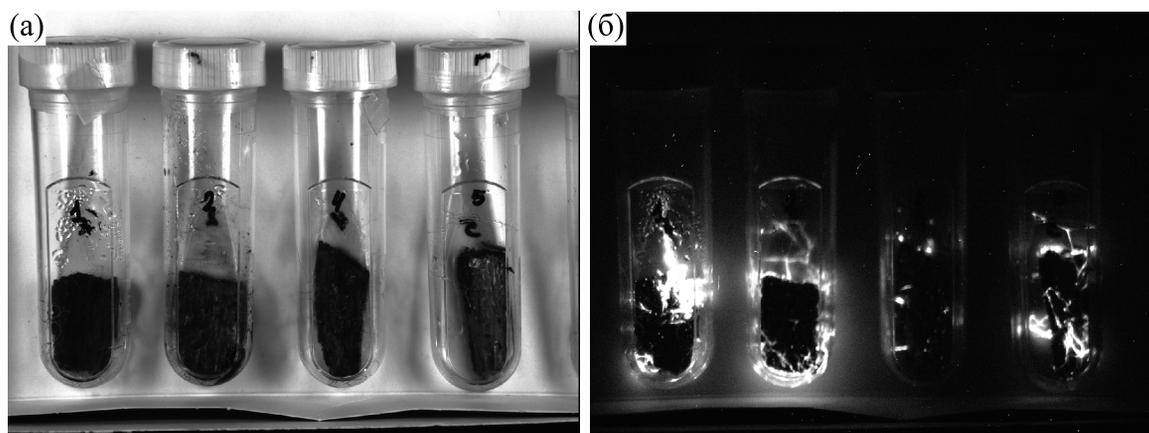


Рис. 4. Внешний вид образцов древесины (а) и люминесценция мицелия гриба через 10 лет хранения в результате механического воздействия (б).

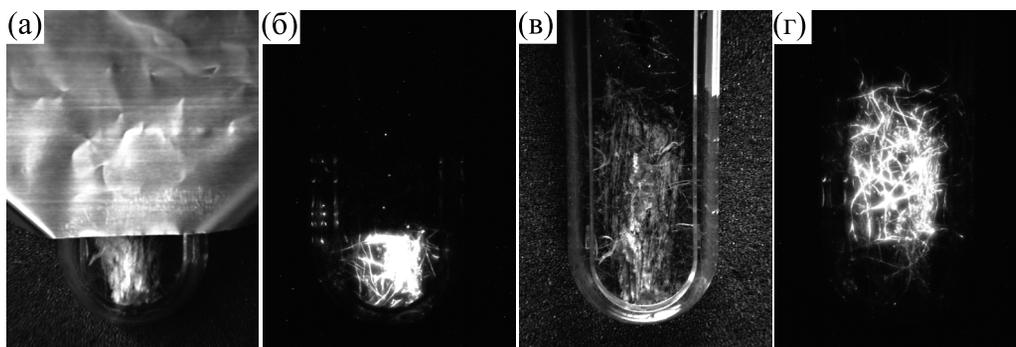


Рис. 5. Внешний вид образца древесины (а, в) и люминесценция мицелия гриба через 10 лет хранения в результате УФ-облучения (б, г).

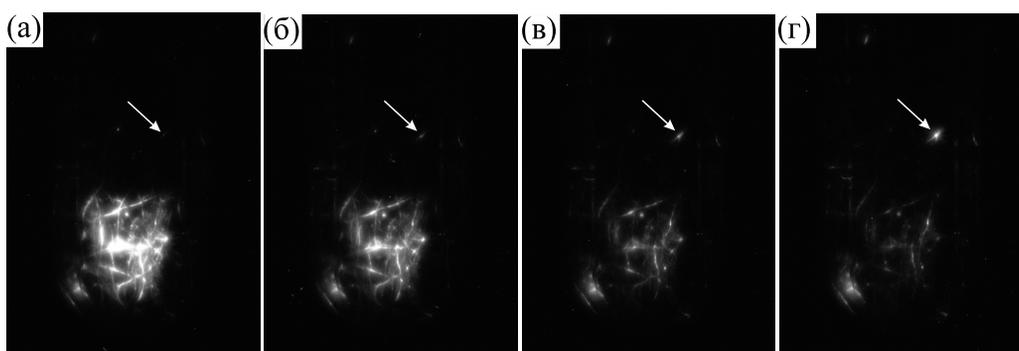


Рис. 6. Динамика развития люминесценции мицелия гриба на необлучаемой УФ-светом области образца древесины (указано стрелкой). Регистрация с интервалом 5 мин.

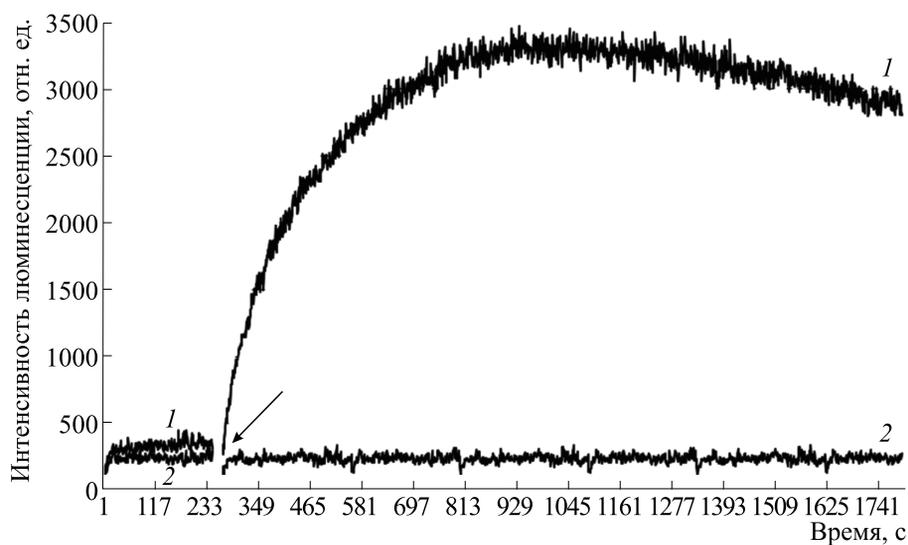


Рис. 7. Различия в кинетике люминесцентной реакции при добавлении к ферментным системам 5 мкл НАДФН (указано стрелкой): 1 – культивирование мицелия на поверхности питательной среды, 2 – культивирование мицелия в объеме питательной среды.

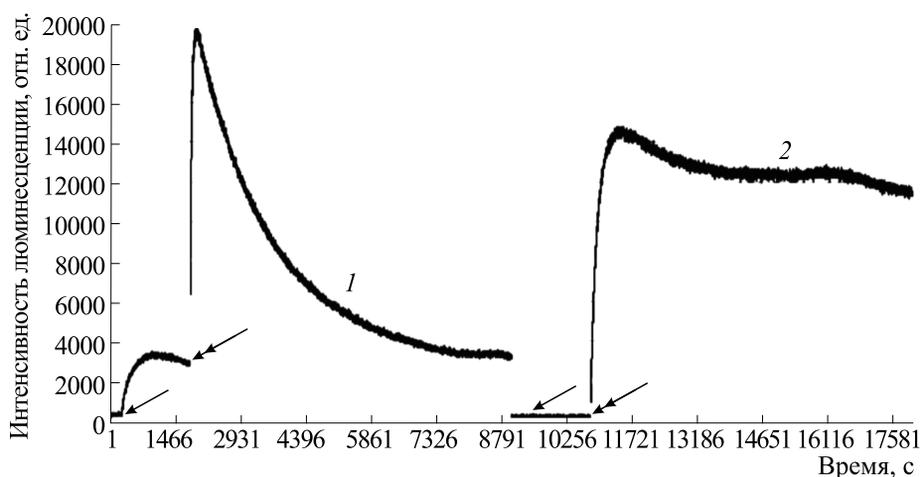


Рис. 8. Кинетика люминесцентных реакций при последовательном добавлении к ферментным системам (1 — поверхностный рост, 2 — глубинный рост мицелия) 5 мкл НАДФН (стрелка) и 5 мкл экстракта *Pholiota squarrosa* (двойная стрелка).

участке образца не регистрируется. После повторного облучения всего образца участок, ранее не подвергавшийся облучению, ярко люминесцирует (рис. 5г). При этом люминесценция участка образца, ранее подвергавшегося облучению, резко снизилась (рис. 5г).

Однако возможен вариант, когда после УФ-облучения регистрируется люминесценция необлученного УФ-светом мицелия. Динамика развития люминесценции на участке образца древесины, необлученном УФ-светом, представлена на рис. 6. Вероятно, за 10 лет хранения мицелий с облученного УФ-светом участка образца пророс в объеме древесины и через некоторое расстояние вышел на ее поверхность. Следовательно, реакция мицелия, вызванная УФ-облучением, проявилась в увеличении люминесценции облученного мицелия и распространилась по его длине в необлученную область образца. Если предположение верно, это означает, что реакция на УФ может передаваться по мицелию на его области, не подвергавшиеся внешнему воздействию, и вызывать увеличение люминесценции.

Можно предположить, что в природных условиях мицелий, на который попал свет утреннего солнца, реагирует подобным образом и передает информацию о наступлении дня мицелию, растущему в глубине древесины или под землей.

Существенные различия в кинетике люминесцентной реакции при внесении в реакционную среду экзогенного субстрата (рис. 8) у ферментных систем *in vitro*, выделенных из биомассы *M. gombakensis*, выросшей на одинаковой питательной среде, и различающихся только по способу культивирования (поверхностный или глубинный) могут означать существенные различия

в метаболизме и требуют дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

Из определения видовой принадлежности следует, что ареалом для вида *M. gombakensis* является не только полуостров Малайзия [11], но и остров Борнео [3].

Наиболее важными являются свойства образцов древесины не разрушаться и не зарастать сторонней микрофлорой. Эти свойства позволили длительное время проводить исследования и получить экспериментальные результаты, приведенные в данной статье.

Согласно экспериментальным данным [12], биолюминесценция привлекает ночных насекомых, которые могут способствовать распространению спор грибов, растущих под пологом леса, где поток ветра значительно уменьшен. Однако значительное увеличение люминесценции (вспышка) при механическом раздражении, означающее увеличение биохимических реакций (метаболизма) в ночное время, может отпугнуть животное или насекомое, желающее полакомиться грибом.

Реакция на УФ-облучение позволяет сделать следующие предположения. Мицелий способен передавать раздражение на расстояние (область, закрытая от УФ-света на рис. 6). Для гриба это может быть сигналом о том, что наступает день и не только на поверхности мицелия, облучаемой солнцем, но и в глубине древесины или под землей, куда солнечные лучи не попадают. Таким образом, возможно, у гриба есть суточная динамика, и он реагирует изменением метаболизма, которое в наших экспериментах проявляется в изменении люминесценции. Иначе говоря, циркадный кон-

троль [12] может осуществляться через возбуждение люминесцентной системы гриба.

На основании низкого уровня люминесценции в случае отсутствия внешних раздражающих факторов (рис. 4–6) возможно предположение о низком уровне биохимических реакций, то есть состоянии «анабиоза».

Ферментные системы, содержащие и не содержащие эндогенный субстрат люминесцентной системы, расширяют возможности люминесцентного метода. Например, появляется возможность отличить субстрат люминесцентной реакции от стимулятора, не являющегося субстратом люминесцентной реакции. Таким образом, выделение двух ферментных систем, отличающихся по наличию эндогенного субстрата, при проведении исследований *in vitro* позволит расширить спектр изучаемых веществ.

Уникальные особенности люминесцентного гриба *M. gombakensis* свидетельствуют о перспективности его использования в биотехнологии и в исследованиях биофизики сложной системы базидиомицетов. К таким наиболее важным особенностям относятся: способность образцов древесины в течение 10 лет в нестерильных условиях сохранять способность к люминесценции; увеличение люминесценции после локального облучения УФ-светом; при культивировании пеллет отсутствие выделения в питательную среду веществ, стимулирующих люминесцентную реакцию *in vitro*; длительная (до 35–50 суток) люминесценция пеллет, находящихся в дистиллированной воде.

В данное время имеются 4 коллекции, в которых поддерживаются культуры гриба *M. gombakensis*, – Mycology Herbarium (KLU-M), Fungal Culture Collection (KUM) в Университете Малайи, Коллекция культур базидиомицетов (БИН РАН, Санкт-Петербург, Россия) и Коллекции культур ИБСО (ИБФ СО РАН, Красноярск, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

В настоящее время исследование выполняется в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2024-0018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sabharwal S. C., Kathuria S. P., and Dhingra M. M. A new bioluminescent fungal system. *J. Biosci.*, **5**, 53–62 (1983). DOI: 10.1007/BF02702593
2. Deheyn D. D. and Latz M. I. Bioluminescence characteristics of a tropical terrestrial fungus (Basidiomycetes). *Luminescence*, **22** (5), 462–467 (2007). DOI: 10.1002/bio.985
3. Puzyr A. P., Medvedeva S. E., and Bondar V. S. The use of glowing wood as a source of luminescent culture of fungus mycelium. *Mycosphere*, **7** (1), 1–17 (2016). DOI: 10.5943/mycosphere/7/1/1
4. Puzyr A. P. and Medvedeva S. E. Luminescence of wood samples during long-term storage. *Mycosphere*, **7** (6), 716–727 (2016). DOI: 10.5943/mycosphere/7/6/2
5. Menkis A., Ihrmark K., Stenlid J., and Vasaitis R. Root-associated fungi of *Rosa rugosa* grown on the frontal dunes of the Baltic Sea Coast in Lithuania. *Microb. Ecology*, **67**, 769–774 (2014). DOI: 10.1007/s00248-013-0351-8
6. Gardes M. and Bruns T. D. ITS Primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecology*, **2**, 113–118 (1993). DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
7. White T. J., Bruns T., Lee S. B., and Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (N.-Y., Acad. Press, 1990), pp. 315–322.
8. Stielow J. B., Levesque C. A., Seifert K. A., Meyer W., Irinyi L., Smits D., Renfurm R., Verkley G. J. M., Groenewald M., Chaduli D., Lomascolo A., Welti S., Lesage-Meessen L., Favel A., Al-Hatmi A. M. S., Damm U., Yilmaz N., Houbraken J., Lombard L., Quaedvlieg W., Binder M., Vaas L. A. I., Vu D., Yurkov A., Begerow D., Roehl O., Guerreiro M., Fonseca A., Samerpitak K., van Diepeningen A. D., Dolatabadi S., Moreno L. F., Casaregola S., Mallet S., Jacques N., Roscini L., Egidi E., Bizet C., Garcia-Hermoso D., Martín M. P., Deng S., Groenewald J. Z., Boekhout T., de Beer Z. W., Barnes I., Duong T. A., Wingfield M. J., de Hoog G. S., Crous P. W., Lewis C. T., Hambleton S., Moussa T. A. A., Al-Zahrani H. S., Almaghrabi O. A., Louis-Seize G., Assabgui R., McCormick W., Omer G., Dukik K., Cardinali G., Eberhardt U., de Vries M., and Robert V. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, **35** (1), 242–263 (2015). DOI: 10.3767/003158515X689135

9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evolution*, **35** (6), 1547–1549 (2018). DOI: 10.1093/molbev/msy096
10. Tajima F. and Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evolution*, **1** (3), 269–285 (1984). DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040317
11. Chew A. L. C., Desjardin D. E., Tan Y. S., Musa M. Y., and Sabaratnam V. Bioluminescent fungi from Peninsular Malaysia. *Fungal Diversity*, **70**, 149–187 (2014). DOI: 10.1007/s13225-014-0302-9
12. Oliveira A. G., Stevani C. V., Waldenmaier H. E., Viviani V., Emerson J. M., Loros J. J., and Dunlap J. C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. *Curr. Biol.*, **25** (7), 964–968 (2015). DOI: 10.1016/j.cub.2015.02.021

Unique Features of the Luminescent Mushroom *Mycena gombakensis*

A.P. Puzyr*, **E.D. Posokhina***, **A.A. Timofeev****, *******, **A.E. Burov***, ********,
S.E. Medvedeva*, and **I.N. Pavlov****, *********

*Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

**Institute of Forest of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

***Laboratory of Genomic Research and Biotechnology, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

****Federal Research Center for Information and Computational Technologies, prosp. Akademika Lavrentieva 6, Novosibirsk, 630090 Russia

*****M.F. Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, prosp. imeni gazety Krasnoyarsky Rabochy. 31, Krasnoyarsk, 660037 Russia

The paper presents the results of study on the luminescent system of the culture of the fungus *Mycena gombakensis* derived out of wood samples. The changes on samples stored for duration of 10 years in non-sterile conditions and the dynamics of luminescent signals are described. A phylogenetic approach was used to recognize fungal species. A number of unique features of *M. gombakensis* are presented expanding the understanding of the properties of luminescent fungi. Research data indicate that *M. gombakensis* can potentially be used both in biotechnology and in the study of biophysics of the complex system of basidiomycetes.

Keywords: bioluminescence of basidiomycetes, Mycena gombakensis, mycelial culture, species identification

УДК 577.3

ИЗМЕРЕНИЯ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИСТАНЦИОННОГО МОНИТОРИНГА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Ю.А. Золин*, Е.М. Сухова*, В.С. Сухов*.*

*Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, просп. Гагарина, 23, Нижний Новгород, 603022, Россия

#E-mail: vssuh@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 04.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Развитие методов дистанционного и проксимального мониторинга ранних фотосинтетических ответов при действии стрессоров является важной сельскохозяйственной и экологической задачей. Фотохимический индекс отражения (photochemical reflectance index, PRI), который преимущественно рассчитывается на основании величин отраженного света на 531 и 570 нм, является потенциально чувствительным к быстрым изменениям фотосинтеза под действием неблагоприятных факторов. Считается, что механизмы изменений PRI включают в себя сжатие хлоропластов и агрегацию светособирающих комплексов, переходы в цикле ксантофиллов и изменения концентрации хлорофиллов и каротиноидов, что затрудняет использование PRI для мониторинга состояния растений. Применение импульсного измерительного света, исследование светоиндуцированных изменений PRI и анализ модифицированных PRI являются подходами для повышения эффективности применения индекса. Нельзя исключать и другие пути для такого повышения (например, развитие методов оценки на PRI-основе RGB-имиджинга). Развитие методов измерения и анализа PRI имеет значительные перспективы для мониторинга стрессовых ответов фотосинтеза у растений.

Ключевые слова: фотохимический индекс отражения, PRI, фотосинтез, дистанционный мониторинг, проксимальный мониторинг, неблагоприятные факторы.

DOI: 10.31857/S0006302924030169, EDN: OEQGTU

Высшие растения играют ключевую роль в сохранении биосферы и поддержании существования человечества [1, 2], при этом фотосинтез, обеспечивающий протекание продукционного процесса, является основой для реализации этой роли. В силу того, что растения ведут неподвижный образ жизни при постоянно меняющихся условиях окружающей среды, они подвержены действию различных неблагоприятных факторов (стрессоров), включая, например, избыточную интенсивность освещения [3, 4] или неоптимальные температуры [5]; такие факторы негативно влияют на параметры фотосинтеза, способствуя снижению продуктивности растений и, в перспективе, их гибели. Ранняя диагностика действия стрессоров, реализуемая путем неинвазивного проксимального (умеренные расстояния до исследуемого объекта) или дистанционного (зна-

чительные расстояния) мониторинга состояния растений, является необходимым условием для принятия защитных мер и, следовательно, играет ключевую роль в сохранении продуктивности и жизни растений при решении сельскохозяйственных и природоохранных задач.

В настоящее время активно развиваются неинвазивные и высокопроизводительные оптические методы проксимального и дистанционного мониторинга состояния растений, среди которых можно выделить мульти- и гиперспектральный имиджинг [6, 7], опирающийся на измерение отраженного света в узких спектральных полосах или на измерение полных спектров отражения растений соответственно. Одним из путей анализа получаемых данных является расчет индексов отражения, представляющих собой безразмерные коэффициенты, которые связаны с определенными характеристиками растения [6], при этом расчет таких индексов обычно базируются на величинах интенсивности отраженного света на двух или трех длинах волн. Существующие в на-

Сокращения: PRI – фотохимический индекс отражения, NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*.

стоящее время индексы отражения позволяют оценивать такие показатели, как объем фотосинтезирующей биомассы и структурные особенности листьев и растительного покрова (вегетационные индексы), концентрацию фотосинтетических пигментов, включая хлорофиллы, каротиноиды и антоцианы (пигментные индексы), содержание воды в листьях (водные индексы) и ряд других показателей растений [6, 8–17].

Фотохимический индекс отражения (photochemical reflectance index, PRI) занимает особое место среди используемых для мониторинга состояния растений индексов отражения, так как он чувствителен к быстрым изменениям в протекании фотосинтетических процессов и, потенциально, позволяет выявлять ранние стрессовые ответы фотосинтеза при действии неблагоприятных факторов [18–22]. В настоящем обзоре мы рассматриваем современные представления о механизмах формирования изменений PRI в различных временных диапазонах, анализируем подходы к повышению эффективности применения фотохимического индекса отражения для оценки фотосинтетических процессов и оцениваем перспективы использования PRI в качестве инструмента для дистанционного и проксимального мониторинга быстрых стрессовых изменений состояния растений в неблагоприятных условиях.

МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ

Известно, что изменение большинства растительных индексов, включая, например, нормализованный вегетационный индекс (normalized difference vegetation index, NDVI [23]) или водные индексы (water index, WI [24, 25], normalized difference water index, NDWI [26]), является достаточно медленным процессом [6]. Несмотря на значительную величину таких изменений (несколько десятых [23–26]), медленный характер изменений может ограничивать их применимость для раннего выявления действия стрессоров на растения. Напротив, фотохимический индекс отражения, предложенный Дж. Гамоном с соавторами в 1992 г. [18] и связанный с фотосинтетическими процессами [21, 22], может меняться в очень широком временном диапазоне [6, 18, 22], в частности, наиболее быстрые изменения PRI («сверхбыстрые» изменения) могут наблюдаться в пределах секунд [27] и даже сотен миллисекунд [28]. Такие результаты показывают, что фотохимический индекс отражения может стать эффективным инструментом для раннего выявления стрессовых изменений фотосинтетических процессов при проксимальном и дистанционном мониторинге растений.

Типичный фотохимический индекс отражения (PRI) [18, 19, 21, 22, 29] представляет собой разностный индекс отражения, которые рассчитывается на основании уравнения (1):

$$PRI = \frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}}, \quad (1)$$

где R_{531} и R_{570} — интенсивности отраженного света (или коэффициенты отражения) на длинах волн 531 нм (измерительная длина волны) и 570 нм (опорная длина волны) соответственно. В основе разработки PRI лежат данные, полученные в работах [18, 19] и показывающие, что в условиях интенсивного освещения коэффициент отражения на длине волны 531 нм снижается, в то время как на длине волны 570 нм этот коэффициент меняется слабо. Результатом подобных изменений является снижение PRI, при этом двухминутного освещения достаточно для развития такого снижения [18].

Исходно предполагалось, что выявленный эффект был обусловлен деэпоксидацией виолаксантина до антероксантина и, затем, зеаксантина в ходе превращений в цикле ксантофиллов [18, 20, 27, 30, 31]. Подобные переходы связаны с защитой фотосинтетического аппарата от избыточного освещения и обусловлены возрастанием градиента протонов на тилакоидной мембране и закислением люмена тилакоидов [32–35], которые развиваются при рассогласовании между транспортом протонов из стромы в люмен в ходе работы электрон-транспортной цепи хлоропластов и выходом протонов из люмена в строму через H^+ -АТФ-синтазу; такое рассогласование может наблюдаться как при избыточной интенсивности освещения, так и при пониженной интенсивности процессов темновой стадии фотосинтеза (например, при инактивации ферментов цикла Кальвина повышенными и пониженными температурами или при закрытии устьиц, вызванном засухой, солевым стрессом, поражением фитопатогенами и т.д.). Известно, что переходы в цикле ксантофиллов активно участвуют в формировании энергозависимой компоненты нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла a (NPQ), облегчая развитие такого тушения при росте градиента рН и закислении люмена [33, 35]; энергозависимая компонента NPQ играет защитную роль, снижая фотоповреждение фотосинтетического аппарата. Процесс превращения виолаксантина в зеаксантин является относительно быстрым, так как оно развивается на временном интервале от нескольких минут до десятков минут (например, 10–15 мин для арабидопсиса и гороха) [36–38]. Таким образом, переходы в цикле ксантофиллов хорошо соответствуют «быстрым» изменениям PRI (например, изменениям в пре-

делах 2–40 мин освещения, показанным в работе [18]).

Однако отмеченные выше сверхбыстрые изменения PRI (сотни миллисекунд и секунды [27, 28]) не могут быть объяснены переходом виолаксантина в зеаксантин, который протекает значительно медленнее [36–38]. Из литературы известно, что активация виолаксантиндеэпоксидазы, катализирующей превращения в цикле ксантофиллов [39], не является единственным следствием закисления люмена. Индуцированные таким закислением протонирование и активация регуляторных PsbS-белков [35, 40, 41], контролирующей диссоциацию суперкомплекса «фотосистема II – светособирающий комплекс фотосистемы II», непосредственно приводит к формированию энергозависимой компоненты NPQ и агрегации светособирающих комплексов фотосистемы II. Последнее влияет на поглощение света с максимумом на 535 нм [35] и является одним из потенциальных механизмов сверхбыстрых изменений PRI. Вызванное закислением люмена быстрое сжатие хлоропластов также рассматривают как возможный механизм таких изменений [27]. Наконец, нельзя полностью исключать, что в сверхбыстрые изменения PRI может вносить некоторый вклад электрохромный сдвиг, представляющий собой возрастание поглощения света с максимумом на 515–520 нм, которое обусловлено влиянием электрического градиента тилакоидных мембран на спектр поглощения каротиноидов [42–44]. В том случае, если последнее предположение верно, можно ожидать, что характерные времена сверхбыстрых изменений PRI могут составлять десятки миллисекунд (время релаксации PRI при выключении света [44]).

Следует отметить, что рассмотренные механизмы быстрых и сверхбыстрых изменений PRI в значительной степени связаны с закислением люмена тилакоидов, которое существенно влияет на фотосинтетические процессы путем стимуляции энергозависимой компоненты NPQ [33, 35, 40, 41] и путем снижения скорости потока электронов в электрон-транспортной цепи хлоропластов [45, 46]. На основании этого можно ожидать, что вызванная действием стрессоров инактивация фотосинтеза (рост NPQ, снижение квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II) должна сопровождаться смещением PRI в более отрицательную область; при этом параметры изменений фотосинтеза и PRI должны быть коррелированы. Существует значительное число работ [14, 19, 20, 27], действительно показывающих такую корреляцию; однако, результаты метаанализов [22, 29] свидетельствуют о том, что связь PRI и фотосинтетических показателей может существенно варьировать. Отчасти это может быть объяснено более низкой корреляцией между фо-

тосинтетическими показателями и PRI во время переходных процессов (в частности, первые минуты после освещения) [38, 47]. С другой стороны, различная направленность связи показателей фотосинтеза и PRI может наблюдаться и при длительном действии стрессоров (например, водном дефиците) [28, 48].

Последний эффект может быть объяснен существованием медленных изменений PRI [6], развивающихся на временных интервалах от суток (или, возможно, часов [48]) – до месяцев и сезонов [49–51]. Такие изменения, по-видимому, связаны с изменением общего количества каротиноидов в листьях растений, а также с соотношением каротиноидов и хлорофиллов в фотосинтетическом аппарате [49–52]. Например, в ряде работ [49, 50] при анализе сезонной изменчивости была выявлена сильная отрицательная корреляция между отношением концентрации каротиноидов к концентрации хлорофиллов и PRI; такая корреляция может оказывать дополнительное модифицирующее влияние на общую величину фотохимического индекса отражения.

Рис. 1 обобщает потенциальные механизмы формирования изменений PRI и показывает приблизительные временные диапазоны для их реализации. Наличие нескольких механизмов изменений фотохимического индекса отражения является одной из возможных причин противоречивых данных о связи PRI и параметров фотосинтеза, которые были показаны в ряде работ [22, 29].

Завершая раздел, следует отметить, что отдельной научной проблемой является оценка величины сдвигов PRI, связанная с различными компонентами изменений. Такая величина существенно варьирует в зависимости от условий измерений, типа и состояния растительного объекта, и в большинстве случаев не превышает 0.005–0.01 для сверхбыстрых изменений PRI [27, 28] и 0.02–0.025 для быстрых изменений индекса [18, 19, 48]. В то же время в отдельных работах показано, что величина быстрых изменений PRI (минутный диапазон) может достигать 0.05 [20]. Величина медленных изменений лежит в пределах 0.02–0.03 в случае исследования изменений, развивающихся в пределах суток-недель [48, 49], но может достигать 0.10–0.25 при исследованиях сезонных изменений [50, 52].

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ PRI ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ И ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ

Как уже отмечалось выше, величина корреляции между PRI и ключевыми показателями фото-



Рис. 1. Потенциальные механизмы формирования изменений сверхбыстрых, быстрых и медленных изменений PRI (см. текст). $\Delta\Psi$ – градиент электрического потенциала на тилакоидной мембране, ΔpH – химический градиент протонов на тилакоидной мембране, ECS – электрохромный сдвиг, LHCII – светособирающий комплекс фотосистемы II. Пунктирной стрелкой обозначено возможное влияние ECS на PRI, которое не было исследовано в экспериментальных и теоретических работах. Сверхбыстрые и быстрые изменения PRI при действии неблагоприятных факторов были направлены в отрицательную сторону. Направление медленных изменений, по-видимому, варьирует; результаты работ [28, 48] показывают возможность сдвига PRI в положительную сторону при действии стрессора (нагрев, водный дефицит).

синтеза, включая NPQ, квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II и эффективность фотосинтетического использования световой энергии, значительно варьирует [22, 29]. При усреднении данных исследований, проведенных в различных условиях, абсолютная величина коэффициента корреляции Пирсона между PRI и фотосинтетическими показателями составляет приблизительно 0.4–0.5 (рис. 2). Можно выделить две группы причин, нарушающих связь величины фотохимического индекса отражения с фотосинтетическими показателями.

Во-первых, это относительно низкая величина изменений PRI при действии неблагоприятных факторов. В условиях различных экспериментов, такие изменения преимущественно варьировали от нескольких тысячных [14, 28, 31, 48] до нескольких сотых [18–20, 27], повышаясь по мере увеличения интенсивности стрессора [27, 31]. Такая амплитуда изменений значительно уступает величине изменений других индексов, индуцированных действием стрессоров (так, например, солевой стресс может снижать NDVI более чем на 0.2 [54]). Негативный эффект от низкой амплиту-

ды изменений может усиливаться вследствие достаточно высокой вариабельности PRI у различных групп растений в благоприятных условиях; так, при исследовании растений гороха разница между минимальной и максимальной средней величиной PRI в контрольных группах для различных экспериментов составляла около 0.01 [28].

Низкая величина изменений PRI повышает требования к точности регистрации отраженного света; в случае проксимального мульти- или гиперспектрального имиджинга, необходимое повышение точности может быть достигнуто путем использования дополнительных импульсов желто-зеленого измерительного света [28, 31] и анализа «разностных» изображений, в которых каждый пиксель представляет собой разность интенсивности отраженного света во время измерительного импульса и во время фонового освещения [28]. Наша предыдущая работа показывает [31], что такой подход позволяет минимизировать влияние фонового освещения на процесс измерения PRI. Он также хорошо согласуется с данными мета-анализа [29], который подтвердил возрастание эффективности оценки фотосинтетических

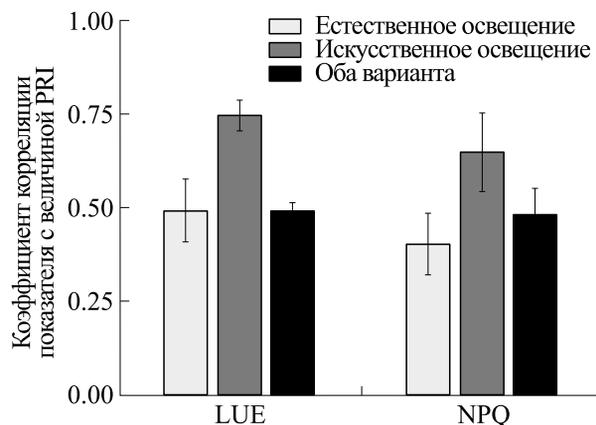


Рис. 2. Средние значения коэффициентов корреляции Пирсона между величиной PRI и величинами эффективности использования света при фотосинтезе (light use efficiency, LUE) и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (non-photochemical quenching, NPQ). Средние значения и стандартные отклонения среднего рассчитаны в рамках ранее выполненного мета-анализа литературных данных [29]. Показатели отдельно рассчитаны для работ с естественным и искусственным освещением, также — для обоих вариантов вместе.

показателей растения на основе измерений PRI в условиях использования освещения искусственным светом. Следует, однако, отметить, что такой подход практически не применим к дистанционному мониторингу растений, так как значительные расстояния между камерой и объектом затрудняют его освещение импульсами измерительного света.

Во-вторых, фактором, осложняющим использование PRI для оценки фотосинтетических показателей в условиях действия стрессоров, являются описанные в предыдущем разделе комплексные механизмы изменения фотохимического индекса отражения. В частности, ряд наших предыдущих исследований, выполненных на проростках гороха, показал снижение типичного PRI при действии на растения избыточного света (минуты) [28, 31, 55] или при развитии быстрых фотосинтетических ответов, вызванных стрессовыми электрическими сигналами (минуты) [14], и небольшое возрастание фотохимического индекса отражения при тепловом шоке (около часа) или развитии водного дефицита (несколько суток) [28, 48, 56]; в условиях длительного действия стрессоров (почвенная засуха или засоление, длящиеся более двух недель) [54, 56] вновь наблюдался сдвиг PRI в отрицательную область. Предположение о разнонаправленном характере сверхбыстрых/быстрых и медленных изменений хорошо объясняет полученные результаты и выявленное влияние длительности действия стрессора на направление изменений PRI.

Исключение медленных изменений PRI из исследования является одним из путей повышения эффективности использования фотохимического индекса для оценки фотосинтетических параметров; такое исключение может быть достигнуто

путем анализа светоиндуцированных изменений PRI ($\Delta PRI = PRI - PRI_0$, где PRI_0 — величина фотохимического индекса отражения в условиях слабого освещения или темноты) [28, 55]. Так, в наших работах [28, 31, 48, 55] показано, что ΔPRI сдвигаются в отрицательную область при действии таких стрессоров, как избыточный свет, температурный шок и водный дефицит; амплитуда такого сдвига варьирует в зависимости от типа и интенсивности стрессора и может достигать 0.012 [31]. Более того, ΔPRI и NPQ связаны между собой линейным уравнением, которое достаточно эффективно описывает эту связь даже при объединении результатов различных экспериментальных серий с действием различных стрессоров и с использованием различных видов сельскохозяйственных растений [28, 31, 48]. Наши результаты хорошо согласуются с данными литературы, которые показывают большую эффективность использования ΔPRI для оценки фотосинтетических показателей по сравнению с PRI [57-59]. Следует отметить, что измерения ΔPRI относительно просто провести для проксимального или дистанционного мониторинга в условиях контролируемого светового потока (например, в теплице с искусственным освещением). Реализация измерений ΔPRI в естественных условиях требует более сложных подходов; в частности, для расчета ΔPRI могут быть использованы измерения фотохимического индекса отражения, сделанные ранним утром (слабое освещение) и при различной интенсивности освещения в дневной период [59]. Другой подход нахождению ΔPRI [60] опирается на использование линейного регрессионного уравнения для оценки PRI_0 на базе величины модифицирован-

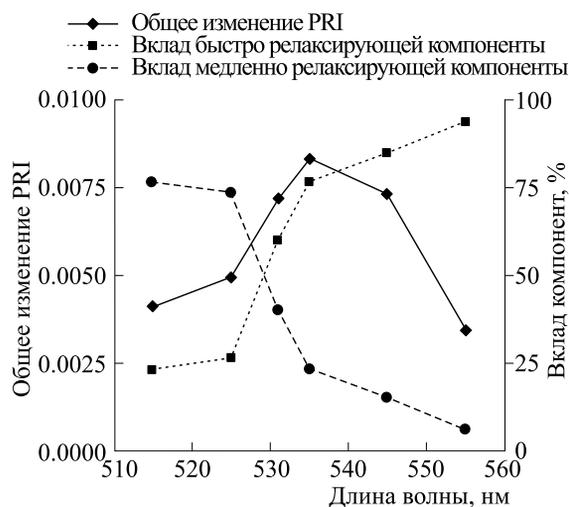


Рис. 3. Зависимость величины общего изменения PRI листа гороха после 5 мин освещения красным светом с интенсивностью $1600 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и вклада быстро релаксирующей и медленно релаксирующей компонент изменения от измерительной длины волны, используемой при расчете фотохимического индекса отражения. Рисунок построен на

основании результатов работы [55]. Типичный и модифицированные PRI рассчитаны как $\frac{R_x - R_{570}}{R_x + R_{570}}$, где R_x — интенсивность отраженного света на измерительной длине волны x , R_{570} — интенсивность отраженного света на опорной длине волны 570 нм. Вклад компонент рассчитывали, как процентную долю от величины общего изменения PRI.

ного NDVI, который может измеряться параллельно измерениям PRI.

Другой путь снижения влияния комплексного характера механизмов изменений PRI на эффективность оценки фотосинтетических показателей может опираться на применение модифицированных фотохимических индексов отражения. В соответствии с работой [19], изменения PRI, связанные с различными механизмами, имеют различные спектральные характеристики; на основании этого можно предполагать, что сдвиг длины волны измерительного света может изменить итоговое соотношение различных механизмов изменений в рассчитываемом индексе. Ранее нами было показано [55], что модифицированные PRI с уменьшенной измерительной длиной волны (менее 525 нм) включают в себя преимущественно медленно-релаксирующую компоненту (вероятно, связанную с переходами в цикле ксантофиллов) (рис. 3). Напротив, модифицированные PRI с увеличенной измерительной длиной волны (535–555 нм) включают в себя преимущественно быстро релаксирующую компоненту (вероятно, связанную с агрегацией светособирающего комплекса фотосистемы II и сжатием хлоропластов) [55]. Анализ «длинноволновых» PRI показывает [54–56], что такие индексы снижаются при действии широкого спектра стрессоров (избыточный свет, нагрев, кратковременный водный дефицит и длительная почвенная засуха, засоление); при этом знак их связи с фотосинте-

тическими показателями не меняется. Такие результаты свидетельствуют о том, что использование модифицированных длинноволновых PRI является перспективным методом повышения эффективности использования фотохимического индекса отражения для оценки фотосинтетических процессов у растения; в частности, в отличие от анализа ΔPRI , измерение модифицированных PRI не требует проведения серии измерений с одного и того же участка растительного покрова в условиях слабого и более сильного света.

Дополнительно следует отметить, что модифицированные коротковолновые PRI возрастают при непосредственных стрессовых воздействиях на световую стадию фотосинтеза (избыточный свет [55]) и снижаются при неблагоприятных воздействиях на темновую стадию (повышенные температуры, водный и солевой стресс [54, 56]). Такой результат хорошо согласуется с работами других авторов [61], показывающих связь модифицированного коротковолнового PRI с максимальной скоростью фотосинтетического карбоксилирования, и открывает потенциальную возможность использования коротковолновых PRI для идентификаций особенностей действующего на растения стрессора.

Следующий подход для повышения эффективности использования PRI в дистанционном и проксимальном мониторинге фотосинтеза растений базируется на одновременном измерении нескольких оптических показателей и последую-

шем применении моделей исследуемого процесса, использующих эти показатели [60, 62, 63]. В частности, разработаны модели, позволяющие достаточно точно прогнозировать фотосинтетическую ассимиляцию CO_2 на основании уравнений, которые включают в себя PRI и интенсивность индуцированной солнечным светом флуоресценции (SIF) [62], или PRI, SIF и модифицированный NDVI [60]. Учитывая, что измерения как SIF [64], так и PRI и NDVI [6] могут осуществляться на значительных расстояниях от объекта, разработка отмеченных моделей создает базу для развития методов дистанционного мониторинга фотосинтетических процессов у растений.

Еще один путь потенциального повышения эффективности использования PRI для задач дистанционного мониторинга может быть связан с анализом пространственной неоднородности в распределении фотохимического индекса отражения. В частности, наши теоретические и экспериментальные результаты, базирующиеся на измерении нециклического потока электронов и скорости ассимиляции CO_2 [65] и на разработке двумерной модели фотосинтеза в листе [65, 66], показывают, что действие неблагоприятных факторов (избыточный свет, засуха) может приводить к возрастанию пространственной неоднородности интенсивности потока электронов в масштабе листа [65]. Учитывая связь фотохимического индекса отражения и фотосинтетических показателей [14, 19, 20, 27], можно ожидать, что воздействие стрессоров должно приводить к возрастанию пространственной неоднородности PRI; т.е. такая неоднородность может, потенциально, быть использована в качестве дополнительного показателя для дистанционного и проксимального мониторинга состояния растений. Однако, такая возможность требует дальнейших экспериментальных и теоретических исследований.

Таким образом, несмотря на ряд ограничений, сопровождающих измерение и интерпретацию PRI, в настоящее время разрабатываются подходы, которые могут быть использованы для повышения эффективности использования фотохимического индекса отражения в качестве инструмента проксимального и дистанционного мониторинга состояния растений (подсветка объектов импульсами измерительного света, исследование светоиндуцированных изменений PRI, анализ модифицированных вариантов индекса, разработка комбинированных моделей, опирающихся на PRI и другие оптические показатели, и, возможно, изучение неоднородности его пространственного распределения).

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ RGB-ИМИДЖИНГА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ

Для измерения фотохимического индекса отражения требуются достаточно сложные технические системы, имеющие высокую себестоимость (в частности, мульти- или гиперспектральные камеры [6, 67]), что создает дополнительные ограничения для использования PRI при решении прикладных (экологический мониторинг, сельское хозяйство) и фундаментальных задач. С другой стороны, в настоящее время все более широкое применение получает RGB-имиджинг, опирающийся на использование относительно недорогих и технически простых цветных камер [68, 69]. В частности, такой имиджинг применяется для идентификации растений конкретных видов, для детектирования их болезней, для оценки содержания фотосинтетических пигментов и азота, для определения водного статуса и для решения ряда других задач. Несмотря на то, что в настоящее время, по-видимому, отсутствуют работы, посвященные оценке PRI на основании показателей RGB-имиджинга, анализ имеющихся предпосылок для разработки методов такой оценки имеет большую практическую значимость. В частности, даже приблизительное определение фотохимического индекса отражения с использованием обычной цветной камеры может многократно повысить доступность этого метода дистанционного мониторинга состояния растений для пользователей.

Исследования, показывающие возможность реконструкции спектров отражения растений на основании их цветных изображений [70–72], являются наиболее важным аргументом в пользу принципиальной реализуемости оценки PRI с использованием RGB-имиджинга. Так, в работе [72] показано, что реконструированные на основании цветных изображений спектры отражения листьев гинкго, могут быть очень близки к непосредственно измеренным спектрам отражения и позволяют рассчитать распределение концентрации хлорофиллов по листу; работа [70] показывает близкую эффективность выявления болезней кукурузы на основании измеренного и реконструированного из цветных изображений спектров отражения. Следует отметить, что в настоящее время существует значительное число методов такой реконструкции, которые могут быть разделены на две большие группы [67]: статистические (априорные) методы, базирующиеся на комбинировании заранее принятых базовых спектров, и методы, базирующиеся на глубоком обучении и анализе получаемых первично данных. Считается, что вторая группа методов более эффективна для реконструкции спектров отра-

жения [67], однако в некоторых работах показана близкая эффективность обоих подходов [73, 74].

В то же время существуют факторы, которые могут препятствовать расчету PRI на основании такой реконструкции и его последующему анализу. Прежде всего, это низкая величина изменений PRI при действии стрессоров [14, 18–20, 27, 28, 31, 48], которая означает, что даже небольшая ошибка спектра, возникающая при его реконструкции из цветного изображения, может оказать значительное искажающее влияние на PRI. Другим фактором является высокий уровень ошибки реконструированного спектра отражения листа в области 530–570 нм (в частности, на измерительной длине волны 530 нм такая ошибка составляет около 10% от величины коэффициента отражения) [72], т.е. в спектральной области, которая используется для расчета типичного PRI [18, 19, 21, 22, 29].

Таким образом, вопрос о возможности оценки PRI на основании цветных изображений остается открытым. Можно ожидать, что дальнейшие экспериментальные и теоретические исследования подтвердят или опровергнут такую возможность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты обзора литературы показывают, что фотохимический индекс отражения (PRI) обладает значительным потенциалом для проксимального и дистанционного мониторинга фотосинтетических процессов растений и является крайне перспективным методом благодаря его высокой чувствительности как к быстрым, так и к медленным стрессовым изменениям фотосинтетического аппарата.

В то же время малая величина изменений PRI при действии стрессоров и комплексный характер механизмов таких изменений создают определенные ограничения для его использования. Применение импульсов измерительного света при регистрации индекса, анализ светоиндуцированных изменений PRI и его модификаций со сдвигом измерительной длины волны, разработка математических моделей, опирающихся одновременно на PRI и другие оптические показатели, и, возможно, анализ параметров пространственной неоднородности фотохимического индекса отражения позволяют минимизировать ограничения использования PRI для дистанционного и проксимального мониторинга состояния растений.

Однако более полная реализация потенциала использования PRI требует дальнейшего совершенствования методов измерения и расчета, а также развития подходов к его анализу. В частности, крайне интересным представляется поиск методов оценки PRI на основании простого

RGB-имиджинга (имиджинга с использованием цветных камер); в случае успешной разработки таких методов они могли бы многократно упростить измерения фотохимического индекса отражения и расширить его применение при решении прикладных и фундаментальных задач.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда. Разделы, посвященные механизмам изменений фотохимического индекса отражения и ограничениям его применения, подготовлены в рамках проекта № 23-14-00127. Раздел, посвященный анализу возможности использования RGB-имиджинга для оценки фотохимического индекса отражения, подготовлен в рамках проекта № 23-76-10048.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pokorný J., Brom J., Cermák J., Hesslerová P., Huryňa H., Nadezhdina N., and Rejšková A. Solar energy dissipation and temperature control by water and plants. *Int. J. Water*, **5** (4), 311–336 (2010). DOI: 10.1504/IJW.2010.038726
2. Ellison D., Morris C. E., Locatelli B., Sheil D., Cohen J., Murdiyarso D., Gutierrez V., Van Noordwijk M., Creed I. F., Pokorný J., Gaveau D., Spracklen D., Bargaés-Tobella A., Hstedt U., Teuling A., Gebrehiwot S. G., Sands D. C., Muys B., Verbist B., Springgay E., and Sullivan C. A. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Glob. Environ. Change*, **43** (51), 51–61 (2017). DOI: 10.1016/j.gloenvcha.2017.01.002
3. Rascher U. and Nedbal L. Dynamics of photosynthesis in fluctuating light. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9** (6), 671–678 (2006). DOI: 10.1016/j.pbi.2006.09.012
4. Smith W. and Berry Z. Sunflecks? *Tree Physiol.*, **33** (3), 233–237 (2013). DOI: 10.1093/treephys/tpt005
5. Nievola C., Carvalho C., Carvalho V., and Rodrigues E. Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, **4** (4), 371–405 (2017). DOI: 10.1080/23328940.2017.1377812
6. Kior A., Sukhov V., and Sukhova E. Application of reflectance indices for remote sensing of plants and re-

- vealing actions of stressors. *Photonics*, **8** (12), 582 (2021). DOI: 10.3390/Photonics8120582
7. Zubler A. V. and Yoon J. Proximal methods for plant stress detection using optical sensors and machine learning. *Biosensors*, **10** (12), 193 (2020). DOI: 10.3390/bios10120193
8. Grace J., Nichol C., Disney M., Lewis P., Quaife T., and Bowyer P. Can we measure terrestrial photosynthesis from space directly, using spectral reflectance and fluorescence? *Global Change Biol.*, **13** (7), 1484–1497 (2007). DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01352.x
9. Weng J. H., Wong S. L., Lai K. M., and Lin R. J. Relationships between photosystem II efficiency and photochemical reflectance index under different levels of illumination: Comparison among species grown at high- and low elevations through different seasons. *Trees*, **26** (2), 343–351 (2012). DOI: 10.1007/s00468-011-0596-0
10. Zhang C., Filella I., Liu D., Ogaya R., Llusà J., Asensio D., and Peñuelas J. Photochemical reflectance index (PRI) for detecting responses of diurnal and seasonal photosynthetic activity to experimental drought and warming in a mediterranean shrubland. *Remote Sens.*, **9** (11), 1189 (2017). DOI: 10.3390/rs9111189
11. Penuelas J., Filella I., Biel C., Serrano L., and Savé R. The Reflectance at the 950–970 Nm Region as an Indicator of Plant Water Status. *Int. J. Remote Sens.*, **14** (10), 1887–1905 (1993). DOI: 10.1080/01431169308954010
12. Gitelson A. and Merzlyak N. spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves. Spectral features and relation to chlorophyll estimation. *J. Plant Physiol.*, **143** (3), 286–292 (1994). DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81633-0
13. Filella I., Amaro T., Araus J. L., and Penuelas J. Relationship between photosynthetic radiation-use efficiency of barley caeopies and the photochemical reflectance index (PRI). *Physiol. Plant.*, **96**, 211–216 (1996). DOI:10.1111/J.1399-3054.1996.TB00204.X
14. Sukhov V., Sukhova E., Gromova E., Surova L., Nerush V., and Vodeneev V. The electrical signal-induced systemic photosynthetic response is accompanied by changes in the photochemical reflectance index in pea. *Funct. Plant Biol.*, **46** (4), 328–338 (2019). DOI: 10.1071/FP18224
15. Badgley G., Field C., and Berry J. Canopy near-infrared reflectance and terrestrial photosynthesis. *Sci. Adv.*, **3** (3), e1602244 (2017). DOI: 10.1126/sciadv.1602244
16. Mahlein A., Steiner H., Dehne H., and Oerke E. C. Spectral signatures of sugar beet leaves for the detection and differentiation of diseases. *Precis. Agric.*, **11** (4), 413–431 (2010). DOI: 10.1007/s11119-010-9180-7
17. Mahlein A. Plant disease detection by imaging sensors - parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Dis.*, **100** (2), 241–254 (2016). DOI: 10.1094/PDIS-03-15-0340-FE
18. Gamon J., Peñuelas J., and Field C. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens. Environ.*, **41** (1), 35–44 (1992). DOI: 10.1016/0034-4257(92)90059-S
19. Gamon J., Serrano L., and Surfus J. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecol.*, **112** (4), 492–501 (1997). DOI: 10.1007/s004420050337
20. Penuelas J., Filella I., and Gamon J. Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance. *New Phytol.*, **131** (3), 291–296 (1995). DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03064.x
21. Garbulsky M., Peñuelas J., Gamon J., Inoue Y., and Filella I. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies: A review and meta-analysis. *Remote Sens. Environ.*, **115** (2), 281–297 (2011). DOI: 10.1016/j.rse.2010.08.023
22. Zhang C., Filella I., Garbulsky M., and Penuelas J. Affecting factors and recent improvements of the photochemical reflectance index (PRI) for remotely sensing foliar, canopy and ecosystemic radiation-use efficiencies. *Remote Sens.*, **8** (9), 677 (2016). DOI: 10.3390/rs8090677
23. Eitel J., Long D., Gessler P., Hunt E. R., and Brown D. J. Sensitivity of ground-based remote sensing estimates of wheat chlorophyll content to variation in soil reflectance. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, **73** (5), 1715–1723 (2009). DOI: 10.2136/sssaj2008.0288
24. Penuelas J., Pinol R., Ogaya R., and Filella I. Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R900/R970). *Int. J. Remote Sens.*, **18** (13), 2869–2875 (1997). DOI: 10.1080/014311697217396
25. Serrano L. and Gorchs G. Water availability affects the capability of reflectance indices to estimate berry yield and quality attributes in rain-fed vineyards. *Agronomy*, **12** (9), 2091 (2022). DOI: 10.3390/agronomy12092091
26. Gao B. NDWI – A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sens. Environ.*, **58** (3), 257–266 (1996). DOI: 10.1016/S0034-4257(96)00067-3
27. Evain S., Flexas J., and Moya I. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sens. Environ.*, **91** (2), 175–185 (2004). DOI: 10.1016/j.rse.2004.03.012
28. Sukhov V., Sukhova E., Khlopkov A., Yudina L., Ryabkova A., Telnikh A., Sergeeva E., Vodeneev V., and Turchin I. Proximal imaging of changes in photochemical reflectance index in leaves based on using pulses of green-yellow light. *Remote Sens.*, **13** (9), 1762 (2021). DOI: 10.3390/rs13091762
29. Sukhova E. and Sukhov V. Connection of the photochemical reflectance index (PRI) with the photosystem II quantum yield and nonphotochemical quenching can be dependent on variations of photosynthetic parameters among investigated plants: A meta-analysis.

- Remote Sens.* **10** (5), 771 (2018). DOI: 10.3390/rs10050771
30. Kohzuma K., Tamaki M., and Hikosaka K. Corrected photochemical reflectance index (PRI) is an effective tool for detecting environmental stresses in agricultural crops under light conditions. *J. Plant Res.*, **134** (4), 683–694 (2021). DOI: 10.1007/s10265-021-01316-1
 31. Sukhova E. and Sukhov V. Analysis of light-induced changes in the photochemical reflectance index (PRI) in leaves of pea, wheat, and pumpkin using pulses of green-yellow measuring light. *Remote Sens.*, **11** (7), 810 (2019). DOI: 10.3390/rs11070810
 32. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1020** (1), 1–24 (1990). DOI: 10.1016/0005-2728(90)90088-L
 33. Niyogi K. K., Grossman A. R., and Björkman O. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell.*, **10** (7), 1121–1134 (1998). DOI: 10.1105/tpc.10.7.1121
 34. Maxwell K. and Johnson G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, **51** (345), 659–668 (2000). DOI: 10.1093/jexbot/51.345.659
 35. Ruban A. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol.*, **170** (4), 1903–1916 (2016). DOI: 10.1104/pp.15.01935
 36. Jahns P. The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants (possible functions of chlorophyll a/b-binding proteins). *Plant Physiol.*, **108** (1), 149–156 (1995). DOI: 10.1104/pp.108.1.149
 37. Nilkens M., Kress E., Lambrev P., Miloslavina Y., Müller M., Holzwarth A. R., and Jahns P. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1797** (4), 466–475 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.01.001
 38. Сухова Е. М., Юдина Л. Ю., Воденеев В. А. и Сухов В. С. Анализ связи изменений фотохимического индекса отражения (PRI) и закисления люмена хлоропластов листьев гороха и герани в условиях кратковременного освещения. *Биологич. мембраны*, **36** (3), 218–228 (2019). DOI: 10.1134/S0233475519030083
 39. Jahns P, Latowski D., and Strzalka K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787** (1), 3–14 (2009). DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.09.013
 40. Li X. P., Gilmore A. M., Caffarri S., Bassi R., Golan T., Kramer D., and Niyogi K. K. Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.*, **279** (22), 22866–22874 (2004). DOI: 10.1074/jbc.M402461200
 41. Belgio E., Duffy C. D. P., and Ruban A. V. Switching light harvesting complex II into photoprotective state involves the lumen-facing apoprotein loop. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15** (29), 12253–12261 (2013). DOI: 10.1039/c3cp51925b
 42. Kramer D. M., Cruz J. A., and Kanazawa A. Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci.*, **8** (1), 27–32 (2003). DOI: 10.1016/s1360-1385(02)00010-9
 43. Klughammer C., Siebke K., and Schreiber U. Continuous ECS-indicated recording of the proton-motive charge flux in leaves. *Photosynth. Res.*, **117**, 471–487 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9884-4
 44. Sukhov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., and Vodeneev V. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1092 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.01092
 45. Tikhonov A. N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **116**, 511–534 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9845-y
 46. Tikhonov A. N. The cytochrome b₆f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiol. Biochem.*, **81**, 163–183 (2014). DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011
 47. Murakami K. and Ibaraki Y. Time course of the photochemical reflectance index during photosynthetic induction: its relationship with the photochemical yield of photosystem II. *Physiol. Plant.*, **165** (3), 524–536 (2019). DOI: 10.1111/ppl.12745
 48. Yudina L., Sukhova E., Gromova E., Nerush V., Vodeneev V., and Sukhov V. A light-induced decrease in the photochemical reflectance index (PRI) can be used to estimate the energy-dependent component of non-photochemical quenching under heat stress and soil drought in pea, wheat, and pumpkin. *Photosynth. Res.*, **146** (1-3), 175–187 (2020). DOI: 10.1007/s11120-020-00718-x
 49. Filella I., Porcar-Castell A., Munné-Bosch S., Back J., Garbulsky M. F., and Penuelas J. PRI assessment of long-term changes in carotenoids/chlorophyll ratio and short-term changes in de-epoxidation state of the xanthophyll cycle. *Int. J. Remote Sens.*, **30** (17), 4443–4455 (2009). DOI: 10.1080/01431160802575661
 50. Porcar-Castell A., Garcia-Plazaola J. I., Nichol C. J., Kolari P., Olascoaga B., Kuusinen N., Fernández-Marín B., Pulkkinen M., Juurola E., and Nikinmaa E. Physiology of the seasonal relationship between the photochemical reflectance index and photosynthetic light use efficiency. *Oecol.*, **170**, 313–323 (2012). DOI: 10.1007/s00442-012-2317-9
 51. Garbulsky M., Peñuelas J., Ogaya R., and Filella, I. Leaf and stand-level carbon uptake of a Mediterranean forest estimated using the satellite-derived reflectance indices EVI and PRI. *Int. J. Remote Sens.*, **34** (4), 1282–1296 (2013). DOI: 10.1080/01431161.2012.718457
 52. Wong C. and Gamon J. Three causes of variation in the photochemical reflectance index (PRI) in evergreen

- conifers. *New Phytol.*, **206** (1), 187–195 (2015). DOI: 10.1111/nph.13159
53. Gitelson A. A., Gamon J. A., and Solovchenko A. Multiple drivers of seasonal change in PRI: Implications for photosynthesis I. Leaf level. *Remote Sens. Environ.*, **191**, 110–116 (2017). DOI:10.1016/j.rse.2016.12.014
54. Sukhova E., Zolin Y., Popova A., Yudina L., and Sukhov V. The influence of soil salt stress on modified photochemical reflectance indices in pea plants. *Remote Sens.*, **15** (15), 3772 (2023). DOI: 10.3390/rs15153772
55. Sukhova E. and Sukhov V. Relation of photochemical reflectance indices based on different wavelengths to the parameters of light reactions in photosystems i and ii in pea plants. *Remote Sens.*, **12** (8), 1312 (2020). DOI: 10.3390/rs12081312
56. Sukhova E., Yudina L., Kior A., Kior D., Popova A., Zolin Y., Gromova E., and Sukhov V. Modified photochemical reflectance indices as new tool for revealing influence of drought and heat on pea and wheat plants. *Plants*, **11** (10), 1308 (2022). DOI: 10.3390/plants11101308
57. Hmimina G., Dufrière E., and Soudani K. Relationship between photochemical reflectance index and leaf ecophysiological and biochemical parameters under two different water statuses: towards a rapid and efficient correction method using real-time measurements. *Plant Cell Environ.*, **37** (2), 473–487 (2014). DOI: 10.1111/pce.12171
58. Kohzuma K. and Hikosaka K. Physiological validation of photochemical reflectance index (PRI) as a photosynthetic parameter using *Arabidopsis thaliana* mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498** (1), 52–57 (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.192
59. Kováč D., Veselovská P., Klem K., Večeřová K., Ač A., Peñuelas J., and Urban O. Potential of photochemical reflectance index for indicating photochemistry and light use efficiency in leaves of european beech and norway spruce trees. *Remote Sens.*, **10** (8), 1202 (2018). DOI: 10.3390/rs10081202
60. Tsujimoto K. and Hikosaka K. Estimating leaf photosynthesis of C₃ plants grown under different environments from pigment index, photochemical reflectance index, and chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.*, **148**, 33–46 (2021). DOI: 10.1007/s11120-021-00833-3
61. Yu Y., Piao J., Fan W., and Yang X. Modified photochemical reflectance index to estimate leaf maximum rate of carboxylation based on spectral analysis. *Environ. Monit. Assess.*, **192** (12), 788 (2020). DOI: 10.1007/s10661-020-08736-x
62. Hikosaka K. and Noda H. M. Modeling leaf CO₂ assimilation and Photosystem II photochemistry from chlorophyll fluorescence and the photochemical reflectance index. *Plant Cell Environ.*, **42** (2), 730–739 (2019). DOI: 10.1111/pce.13461
63. Hikosaka K. and Tsujimoto K. Linking remote sensing parameters to CO₂ assimilation rates at a leaf scale. *J. Plant Res.*, **134** (4), 695–711 (2021). DOI: 10.1007/s10265-021-01313-4
64. Porcar-Castell A., Tyystjärvi E., Atherton J., van der Tol C., Flexas J., Pfündel E. E., Moreno J., Frankenberg C., Berry J. A. Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. *J. Exp. Bot.*, **65** (15), 4065–4095 (2014). DOI: 10.1093/jxb/eru191
65. Sukhova E., Ratnitsyna D., Gromova E., and Sukhov V. Development of two-dimensional model of photosynthesis in plant leaves and analysis of induction of spatial heterogeneity of CO₂ assimilation rate under action of excess light and drought. *Plants*, **11** (23), 3285 (2022). DOI: 10.3390/plants11233285
66. Sukhova E., Ratnitsyna D., and Sukhov V. Simulated analysis of influence of changes in H⁺-ATPase activity and membrane CO₂ conductance on parameters of photosynthetic assimilation in leaves. *Plants*, **11** (24), 3435 (2022). DOI: 10.3390/plants11243435
67. Zhang J., Su R., Fu Q., Ren W., Heide F., and Nie Y. A survey on computational spectral reconstruction methods from RGB to hyperspectral imaging. *Sci. Rep.*, **12**, 11905 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-16223-1
68. Gupta S. D., Ibaraki Y., and Trivedi P. Applications of RGB color imaging in plants. In *Plant Image Analysis: Fundamentals and Applications*; Ed. by S. D. Gupta and Y. Ibaraki (Taylor & Francis eBooks, Boca Raton, 2014), pp. 41–62. DOI: 10.1201/b17441-4
69. Al-Tamimi N., Langan P., Bernád V., Walsh J. J., Mangina E., and Negrao S. Capturing crop adaptation to abiotic stress using image-based technologies. *Open Biol.*, **12** (6), 210353 (2022). DOI: 10.1098/rsob.210353
70. Fu J., Liu J., Zhao R., Chen Z., Qiao Y., and Li D. Maize disease detection based on spectral recovery from RGB images. *Front. Plant Sci.*, **13**, 1056842 (2022). DOI: 10.3389/fpls.2022.1056842
71. Hamzah R., Abu Samah K. A. F., and Abdullah M. F., Investigation of RGB to HSI conversion methods for early plant disease detection using hierarchical synthesis convolutional neural networks. *Int. J. Inform. Visual.*, **6** (1), 1–5 (2022). DOI: 10.30630/joiv.6.1.852
72. Gong L., Zhu C., Luo Y., and Fu X. Spectral reflectance reconstruction from Red-Green-Blue (RGB) images for chlorophyll content detection. *Appl. Spectrosc.*, **77** (2), 200–209 (2023). DOI: 10.1177/00037028221139871
73. Lin Y.-T. and Finlayson G. D. A Rehabilitation of Pixel-Based Spectral Reconstruction from RGB Images. *Sensors*, **23** (8), 4155 (2023). DOI: 10.3390/s23084155
74. Lin Y.-T. and Finlayson G. D. An investigation on worst-case spectral reconstruction from RGB images via Radiance Mondrian World assumption. *Color Res. Appl.*, **48** (2), 230–242 (2023). DOI: 10.1002/col.22843

Measurements of Photochemical Reflectance Index as a Tool for Remote Monitoring of Photosynthetic Parameters of Plants

Yu.A. Zolin*, E.M. Sukhova*, and V.S. Sukhov*

**Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

The development of remote and proximal sensing techniques for early detection of photosynthetic responses under action of stressors is an important agricultural and environmental task. The photochemical reflectance index (PRI), typically calculated on the basis of the reflected light at 531 and 570 nm, is potentially sensitive to rapid changes in photosynthesis under unfavorable conditions. Mechanisms of PRI changes are thought to include chloroplast shrinkage and aggregation of light-harvesting complexes, transitions in the xanthophyll cycle, and changes in chlorophyll and carotenoid concentrations, making PRI difficult to be applied for monitoring plant health. Light measurement, the study of light-induced changes in PRI, and the analysis of modified PRIs are the ways for improving the efficiency of the application of PRI. Other ways may also favor improvement of the efficiency (for example, the development of methods of PRI estimation based on RGB imaging). The development of PRI measurement and analysis techniques holds significant promise for monitoring photosynthetic responses of plants to stressed environments.

Keywords: photochemical reflectance index, PRI, photosynthesis, remote monitoring, proximal monitoring, adverse factors

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ЛОКАЛЬНОГО УМЕРЕННОГО НАГРЕВА И ОСВЕЩЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВОДНОГО ОБМЕНА ИНТАКТНЫХ ЧАСТЕЙ ПШЕНИЦЫ, ИЗМЕРЕННЫЕ ТЕПЛОВИЗИОННЫМ МЕТОДОМ

© 2024 г. А.Ю. Попова^{*,#}, Ю.А. Золин^{*}, В.С. Сухов^{*}, Е.М. Сухова^{*}, Л.М. Юдина^{*}

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, просп. Гагарина, 23, Нижний Новгород, 603022, Россия*

#E-mail: lyubovsurova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 24.02.2024 г.

Принята к публикации 06.03.2024 г.

Природные стресс-факторы могут приводить к потере урожая, но при их локальном действии происходит распространение стрессовых сигналов, модифицирующих физиологическое состояние и повышающих устойчивость растений. Цель работы – исследование влияния комбинации локальных факторов на показатели водного обмена при поливе и засухе. Пшеницу выращивали в вегетационной комнате, засуху создавали прекращением полива. Для оценки водного обмена применяли модифицированный индекс проводимости устьиц, измеренный тепловизором, величины водной проводимости листа и относительного содержания воды в листьях. Было показано, что индекс проводимости снижался при засухе и имел сильную корреляцию с водным статусом растения ($R > 0.7$, $p < 0.05$). При поливе комбинированное воздействие приводило к снижению индекса проводимости по сравнению с вариантом без стимуляции, ответ уменьшался с увеличением расстояния от зоны стимуляции. Почвенная засуха снижала амплитуду изменений индекса проводимости. Локальное действие только нагрева или только освещения не вызывало его изменений. Результаты показывают, что локальное действие комбинации нагрева и освещения вызывает стрессовые сигналы, снижающие водный обмен пшеницы. Потенциально такие сигналы могут иметь электрическую природу, однако отсутствие изменений индекса проводимости при засухе и действии только нагрева не подтверждают эту гипотезу.

Ключевые слова: локальный нагрев; локальное освещение; стрессовые сигналы; модифицированный индекс проводимости устьиц; засуха; пшеница.

DOI: 10.31857/S0006302924030171, EDN: OENPCO

Воздействие на растение стрессоров абиотического и биотического характера является одной из ключевых проблем в сфере сельского хозяйства, поскольку может приводить к гибели растений, а также к снижению количества и качества урожая. Одним из наиболее значимых абиотических стрессоров является почвенная засуха, которая приводит к возникновению водного дефицита у растений [1–3].

Для оценки минимизации ущерба от засухи выделяют два направления исследований. Во-первых, развитие методов дистанционного мониторинга [4], в частности, одним из перспектив-

ных методов является тепловидение [5, 6], которое используется для расчета модифицированного индекса проводимости устьиц (modified index of stomatal conductance, mIg) и для последующей оценки пространственного распределения транспирационного процесса. Во-вторых, активно развиваются методы, обеспечивающие сохранение продуктивности растений в засушливых условиях, включая получение новых засухоустойчивых линий и сортов, а также экстренные и длительные защитные меры сохранения растений с помощью орошения и обработки регуляторными соединениями [2, 3, 7].

В настоящее время идет активный поиск и выявление естественных механизмов, обеспечивающих сохранение продуктивности растений при почвенной засухе, такие механизмы могут стать основой для развития методов повышения засухоустойчивости растений [8, 9].

Сокращения: mIg – модифицированный индекс проводимости устьиц, RWC – относительное содержание воды, G – проводимость устьиц листа, T_{leaf} – температура листа, T_D – температура сухой поверхности, T_W – температура смоченной поверхности, R^2 – коэффициент детерминации, R – коэффициент корреляции.

Потенциально, в качестве такого механизма могут быть использованы дистанционные сигналы, способные у высших растений распространяться на дальние расстояния от места воздействия [10–12]. Характерным примером дистанционных сигналов растений могут служить электрические сигналы – потенциал действия и переменный потенциал, генерирующиеся по типу деполяризации, и системный потенциал, генерирующийся по типу гиперполяризации [13, 14]. Они генерируются при локальном действии стрессоров различной природы и, распространяясь, вызывают физиологический ответ, включающий в себя экспрессию защитных генов, изменение фотосинтеза и транспирации и другие ответы [12–14], а итоговые физиологические изменения, по-видимому, направлены на повышение устойчивости растений к действию стрессоров [12].

Известно, что дистанционные сигналы, в том числе и электрической природы, могут генерироваться при умеренных воздействиях [15–17], характерных для естественных условий, например, имеются данные о том, что локальное освещение способно вызывать распространяющиеся электрические сигналы, в частности, потенциалы действия [18]. Распространяясь по растению, такие сигналы либо одиночно, либо в комбинации с другими стрессовыми сигналами (гидравлическими и химическими) могут участвовать в повышении устойчивости растений к почвенной засухе.

Таким образом, целью настоящей работы стало исследование влияния комбинации локального умеренного нагрева и освещения на показатели водного обмена интактных частей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях полива и засухи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве объекта исследования использовали мягкую яровую пшеницу (*Triticum aestivum* L., сорт «Дарья»). Растения выращивали в вегетационной комнате при температуре около 24°C и 16-часовом световом режиме. Выращивание производили на универсальном грунте в горшках по 4 растения. Эксперимент начинали при достижении растениями возраста 13–14 суток (стадия четырех листьев). Полив контрольных растений проводили через день, индукцию засухи осуществляли прекращением полива на 7 суток (умеренная почвенная засуха). Пшеница является широко распространенным сельскохозяйственным растением, часто подвергающимся засухе в природных условиях, поэтому она была выбрана в качестве объекта для анализа.

Умеренное стрессовое воздействие на растение. В соответствии с нашими предыдущими работами локальные умеренные стимулы, характерные для

природных условий, способны приводить к распространению по растению дистанционных сигналов [16] и вызывать изменения фотосинтетических процессов [17]. Поэтому в качестве локального стимула была выбрана комбинация нагрева и действия освещения с высокой интенсивностью на кончик листа, так как именно эти факторы наблюдаются при развитии почвенной засухи в условиях жаркой и солнечной погоды (рис. 1). Для генерации дистанционных сигналов проводили одновременное воздействие на лист растения света (540 мкмоль м⁻¹с⁻¹, синий свет [19]) в течение 10 мин и нагрева (~ 40°C), который действовал на растение до конца эксперимента. Интенсивность освещения оценивали с помощью измерителя светового потока PM100D (Thorlabs, США). Нагрев осуществляли при помощи элемента Пельтье, синий свет ($\lambda_{\text{max}} = 460$ нм) локально освещал небольшой участок листа при помощи светодиода, закрепленного в непрозрачной трубке (диаметр сечения 1 см). Стимуляция проводилась после 1 ч адаптации растения.

Оценка относительного содержания воды в растении и водной проводимости листа. Относительное содержание воды (RWC) определяли для всех растений в горшке и оценивали как отношение разницы сырого и сухого веса к сырому весу растений, сухой вес измерялся после 2 ч просушивания в термостате при 100°C. Водную проводимость листа (G) определяли с использованием инфракрасного газоанализатора GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Германия), исследование проводили на двух растениях из каждого горшка. При анализе использовали по 6 (анализ RWC) или 7 (анализ G) горшков растений, подверженных засухе (опыт), и по 3 горшка в условиях регулярного полива растений (контроль).

Оценка процессов водного обмена с использованием тепловизора. Для ускоренной оценки содержания воды и интенсивности транспирации был использован тепловизор testo 885-2 (Testo SE & Co. KGaA, Германия) (рис. 1), позволяющий оценить пространственное распределение исследуемых показателей. При этом путем сопоставления температуры растения с температурами влажной и сухой калибровочных поверхностей рассчитывали модифицированный индекс проводимости устьиц mI_g по формуле (1):

$$mI_g = \frac{(T_D - T_{\text{leaf}})}{(T_D - T_w)}, \quad (1)$$

где T_{leaf} , T_D и T_w – температура листа, сухой и смоченной поверхности.

Такой индекс базировался на индексе проводимости устьиц из работ [5, 6], но был модифицирован, чтобы его изменения варьировали в пределах от 0 до 1. При анализе использовали по

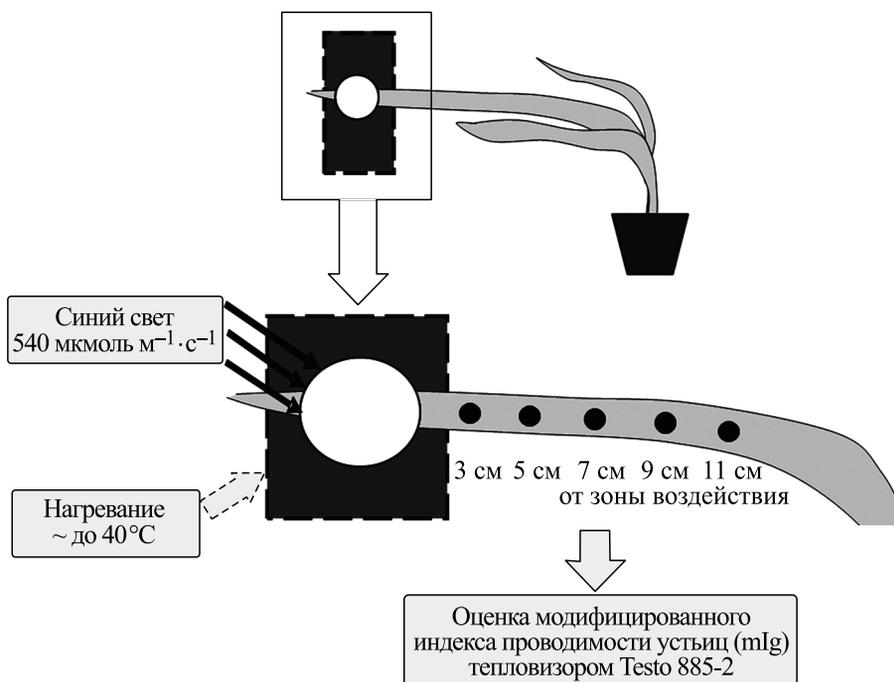


Рис. 1. Схема основных экспериментов по анализу влияния комбинации локального нагрева и освещения на параметры фотосинтеза и модифицированный индекс проводимости устьиц у растений пшеницы.

6–7 горшков растений в разных сериях эксперимента, подверженных засухе, и по 3 горшка контрольных растений. В каждом горшке измеряли температуру 10 листьев. Листья, подверженные воздействию стрессоров, и листья без стимуляции измеряли одновременно, для анализа использовали изменения mIg по отношению к уровню до воздействия. Измерения осуществляли в течение 15 мин перед стимуляцией и 45 мин после стимуляции в условиях белого актиничного света с интенсивностью 456 мкмоль м⁻²с⁻¹.

Статистическая обработка результатов. Биологическая повторность экспериментов составляла в различных вариантах 8–12 растений. Рассчитывали средние значения и стандартные отклонения среднего исследованных величин, был проведен корреляционный анализ. Для оценки статистической значимости всех выявленных различий применяли *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применимость модифицированного индекса проводимости устьиц для оценки динамики показателей водного обмена. Рис. 2а показывает, что на 7-е сутки после прекращения полива (умеренная почвенная засуха) относительное содержание воды снижалось по сравнению с контролем (90 и 93% для опыта и контроля соответственно). Водная проводимость листа (рис. 2б) в условиях полива у контрольных растений составляла

65 ммоль м⁻²с⁻¹. На 7-е сутки после прекращения полива различия между опытом и контролем имели статистически значимый характер, водная проводимость листа опытных растений составляла около 39 ммоль м⁻²с⁻¹.

Таким образом, полученные результаты показывают, что умеренная почвенная засуха (7 суток без полива) вызывает снижение содержания воды в листьях и уменьшение проводимости устьиц.

Далее для анализа применимости тепловизионного метода к оценке процессов водного обмена растений модифицированный индекс проводимости устьиц (mIg) измеряли в контроле (при систематическом поливе) и при почвенной засухе и анализировали связь mIg с исследованными показателями водного обмена. Было показано (рис. 2в), что индекс mIg достоверно снижается при почвенной засухе по сравнению с контролем, на 7-е сутки засухи такое снижение составило более 50%.

Анализ связи модифицированного индекса проводимости устьиц с содержанием воды в растении, проведенный по опытным и контрольным значениям, показал высокую достоверную линейную корреляцию ($R = 0.82$, $p < 0.05$) (рис. 3а). Важно отметить, что значительные изменения mIg наблюдались при очень малых сдвигах RWC (около 3%). Это показывает высокую чувствительность модифицированного индекса проводимости устьиц к содержанию воды в листе и пока-

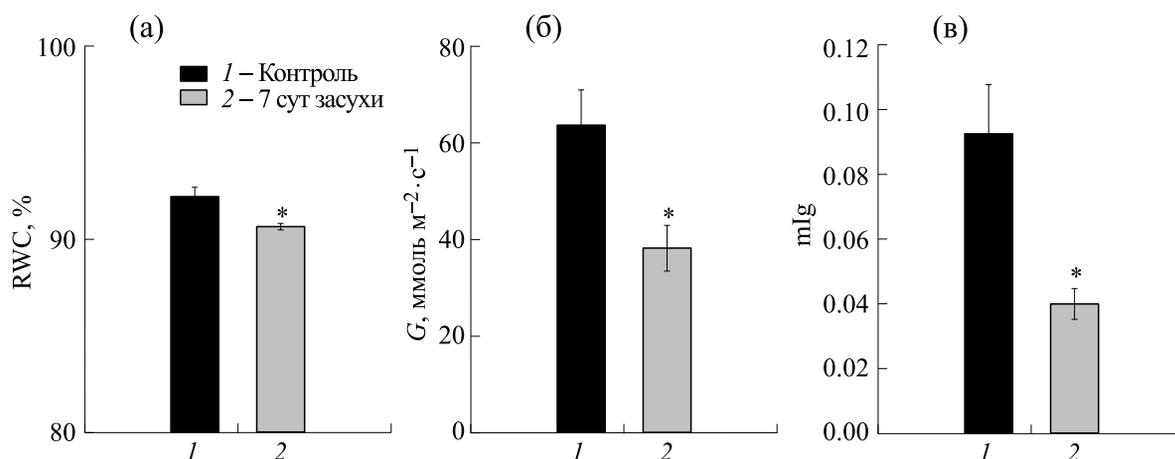


Рис. 2. Влияние умеренной почвенной засухи (7 сут) на относительное содержание воды в растении (а), водную проводимость листа (б) и модифицированный индекс проводимости устьиц (в) листьев пшеницы. * – Различия между опытом (7 сут засухи) и контролем (полив) имели статистически значимый характер ($p < 0.05$).

зывает возможность его использования для выявления даже небольших изменений RWC.

Анализ связи модифицированного индекса проводимости устьиц с водной проводимостью устьиц, проведенный по опытным и контрольным значениям, показал высокую достоверную линейную корреляцию ($R = 0.72$, $p < 0.05$) (рис. 3б). Полученный результат показывает возможность использования mIg для оценки еще одного ключевого показателя водного обмена – водной проводимости устьиц.

Таким образом, полученные результаты показывают, что mIg статистически значимо линейно связан с изменениями относительного содержа-

ния воды и водной проводимости устьиц у растений пшеницы. При этом снижение mIg показывает уменьшение таких показателей, а увеличение mIg – возрастание. Полученные результаты позволяют использовать mIg для оценки показателей водного обмена листьев пшеницы (RWC и G), включая оценку пространственного распределения этих показателей.

Влияние комбинации локального умеренного нагрева и освещения на модифицированный индекс проводимости устьиц в интактных частях листа пшеницы при поливе и умеренной засухе. Далее было исследовано комбинированное локальное действие нагрева (до 40°C) и освещения (синий

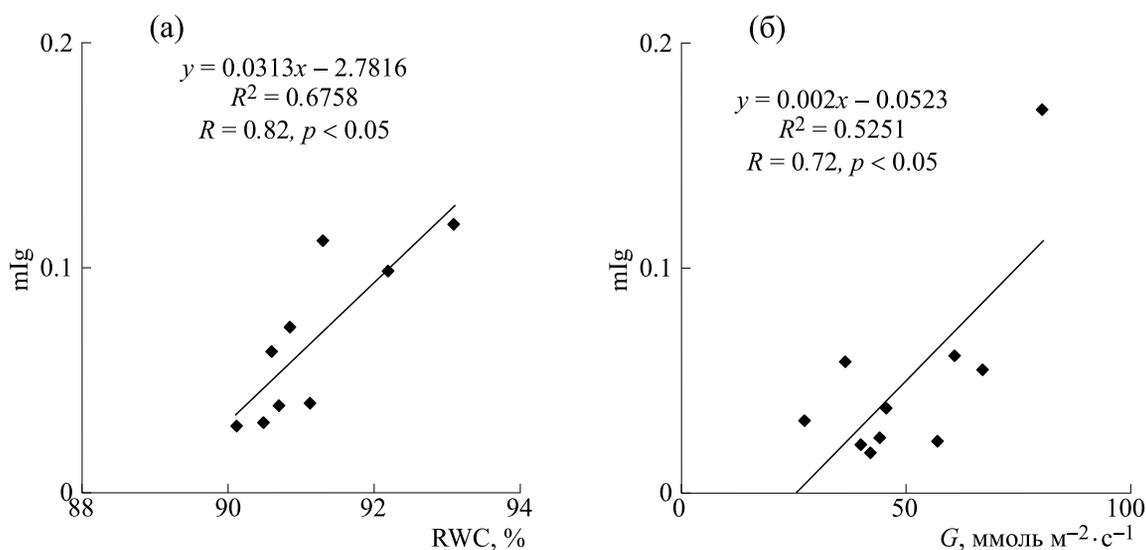


Рис. 3. Диаграммы рассеяния между модифицированным индексом проводимости устьиц и относительным содержанием воды в растении (а) и водной проводимостью листа (б), построенные для опыта (после 7 сут засухи) и контроля (полив), каждая точка показывает усредненные значения по отдельному горшку. R^2 и R – коэффициенты детерминации и корреляции.

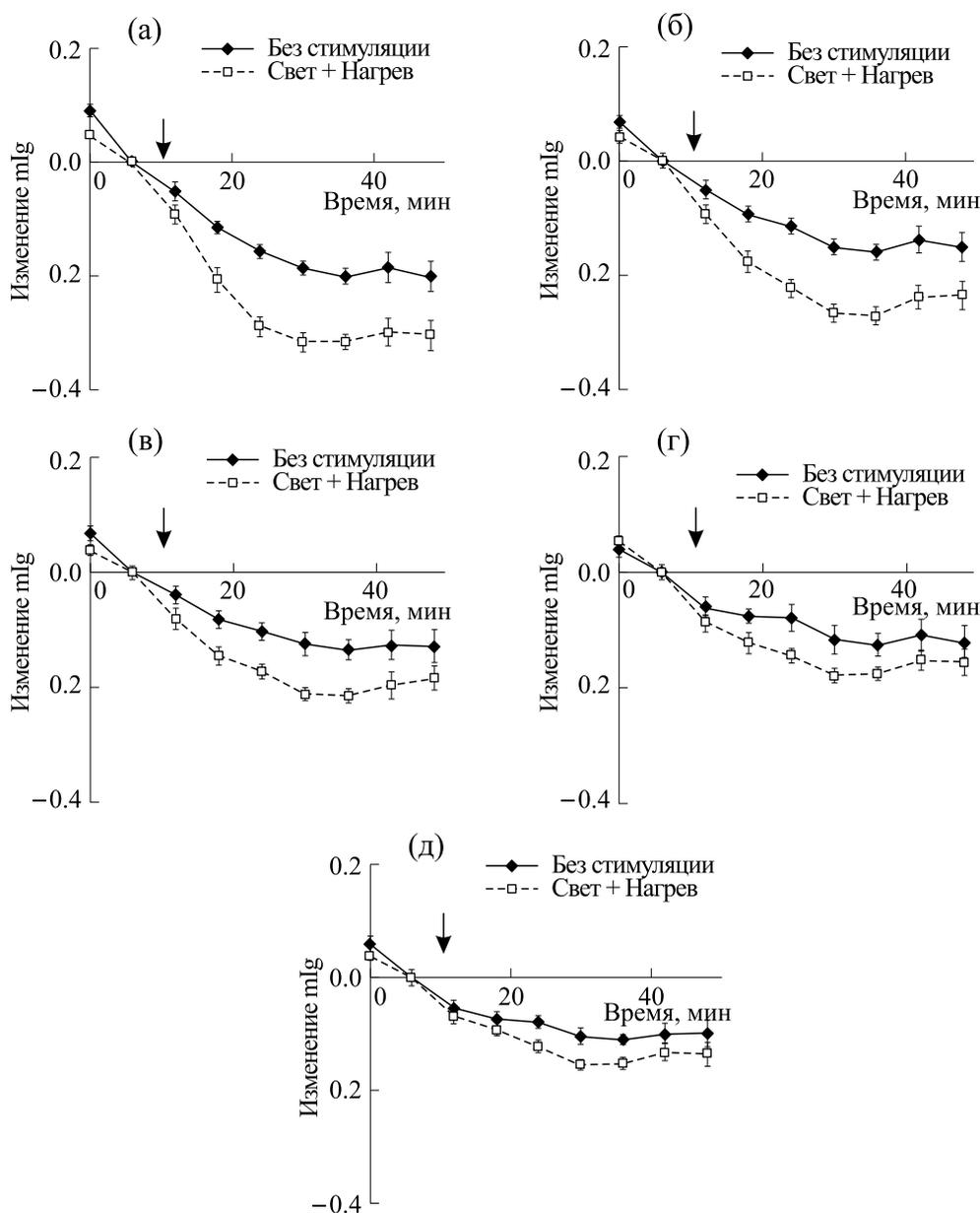


Рис. 4. Влияние локального нагрева и освещения кончика листа на модифицированный индекс проводимости устьиц листа пшеницы на расстоянии 3 см (а), 5 см (б), 7 см (в), 9 см (г) и 11 см (д) от зоны воздействия стрессоров ($n = 12$). Листья, подверженные воздействию стрессоров, и листья без стимуляции измеряли одновременно. Для анализа использовали изменения mIg по отношению к уровню до воздействия. Стрелкой показан момент начала стимуляции.

свет, $540 \text{ мкмоль м}^{-1}\text{с}^{-1}$) кончика листа пшеницы на величину mIg в интактных частях этого листа. Ранее было показано, что такая стимуляция способна приводить к распространению по растению дистанционных сигналов [16] и вызывать изменения фотосинтетических процессов [17]. Можно предположить, что такое воздействие способно индуцировать изменения показателей водного обмена листа пшеницы в его интактных частях.

Анализ модифицированного индекса проводимости устьиц показал, что при локальном воз-

действии света и нагрева происходит снижение mIg в интактных частях растения. Выявленный ответ продолжался не менее 45 мин (рис. 4). При этом амплитуда эффекта уменьшалась с увеличением расстояния от зоны стимуляции, однако небольшой эффект сохранялся даже на максимальном исследованном расстоянии (11 см).

При умеренной почвенной засухе (7 суток без полива) при совместном действии локального освещения и нагрева достоверных изменений модифицированного индекса устьичной проводимости не наблюдалось (рис. 5). Важно отметить,

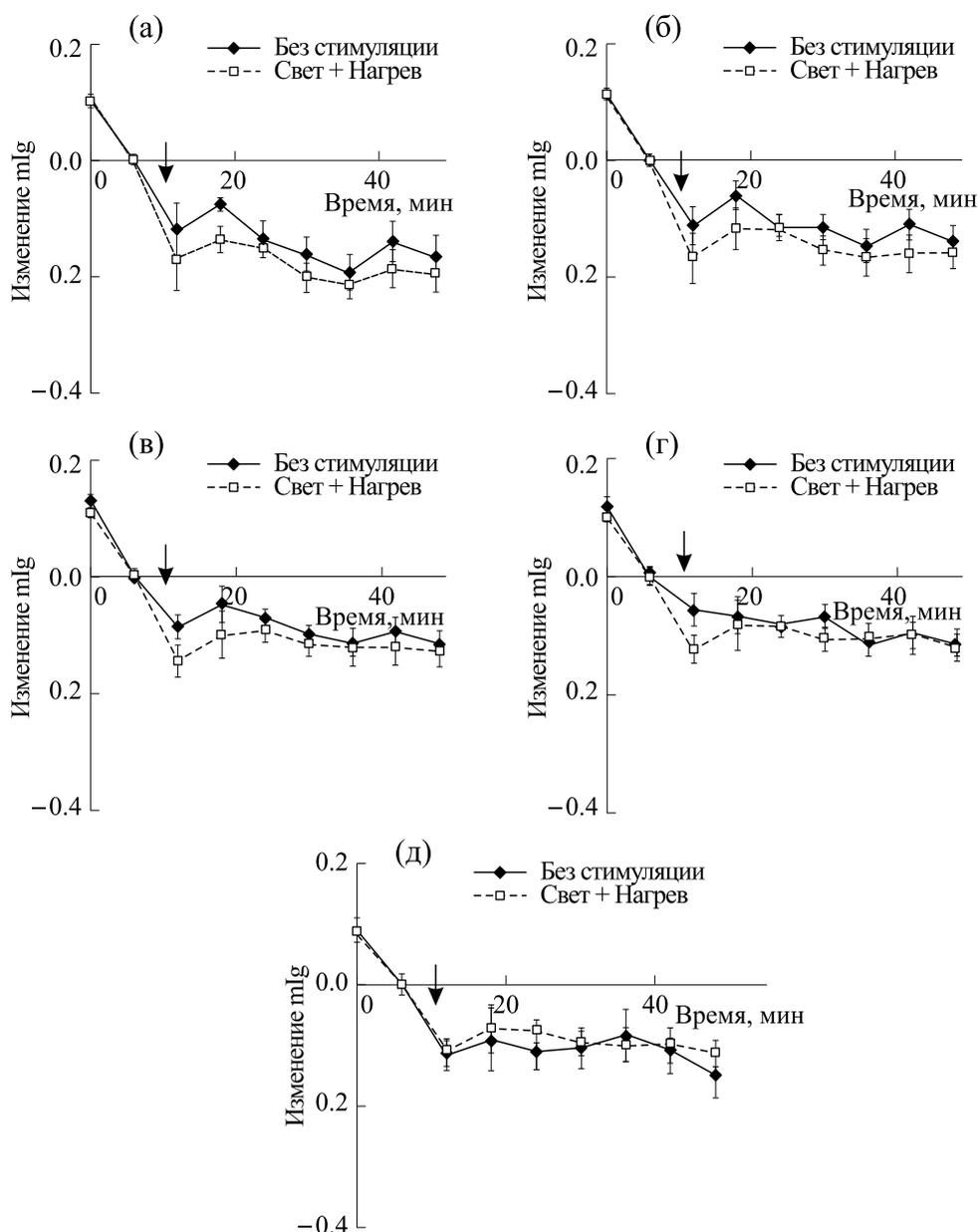


Рис. 5. Влияние локального нагрева и освещения кончика листа на модифицированный индекс проводимости устьиц листа пшеницы на расстоянии 3 см (а), 5 см (б), 7 см (в), 9 см (г) и 11 см (д) от зоны воздействия стрессоров в условиях семисуточной засухи ($n = 12$). Листья, подверженные воздействию стрессоров, и листья без стимуляции измеряли одновременно. Для анализа использовали изменения mIg по отношению к уровню до воздействия. Стрелкой показан момент начала стимуляции.

что исследованная умеренная почвенная засуха вызывает значительное снижение амплитуды вызванных локальным комбинированным воздействием изменений mIg . Такой результат показывает значительное влияние умеренной почвенной засухи на вызванные локальными стимулами ответы водного обмена.

Анализ влияния действия только локального освещения или только локального нагрева на модифицированный индекс проводимости устьиц. Ранее было показано [16], что локальный нагрев вызы-

вал дистанционные электрические сигналы, близкие к сигналам, возникающим при комбинации освещения и нагрева, напротив, локальное освещение вызывало гиперполяризационные сигналы со значительно меньшей амплитудой. Вследствие этого следующим этапом работы стал анализ изменений, модифицированного индекса устьичной проводимости отдельно при стимуляции в виде локального освещения или в виде локального нагрева.

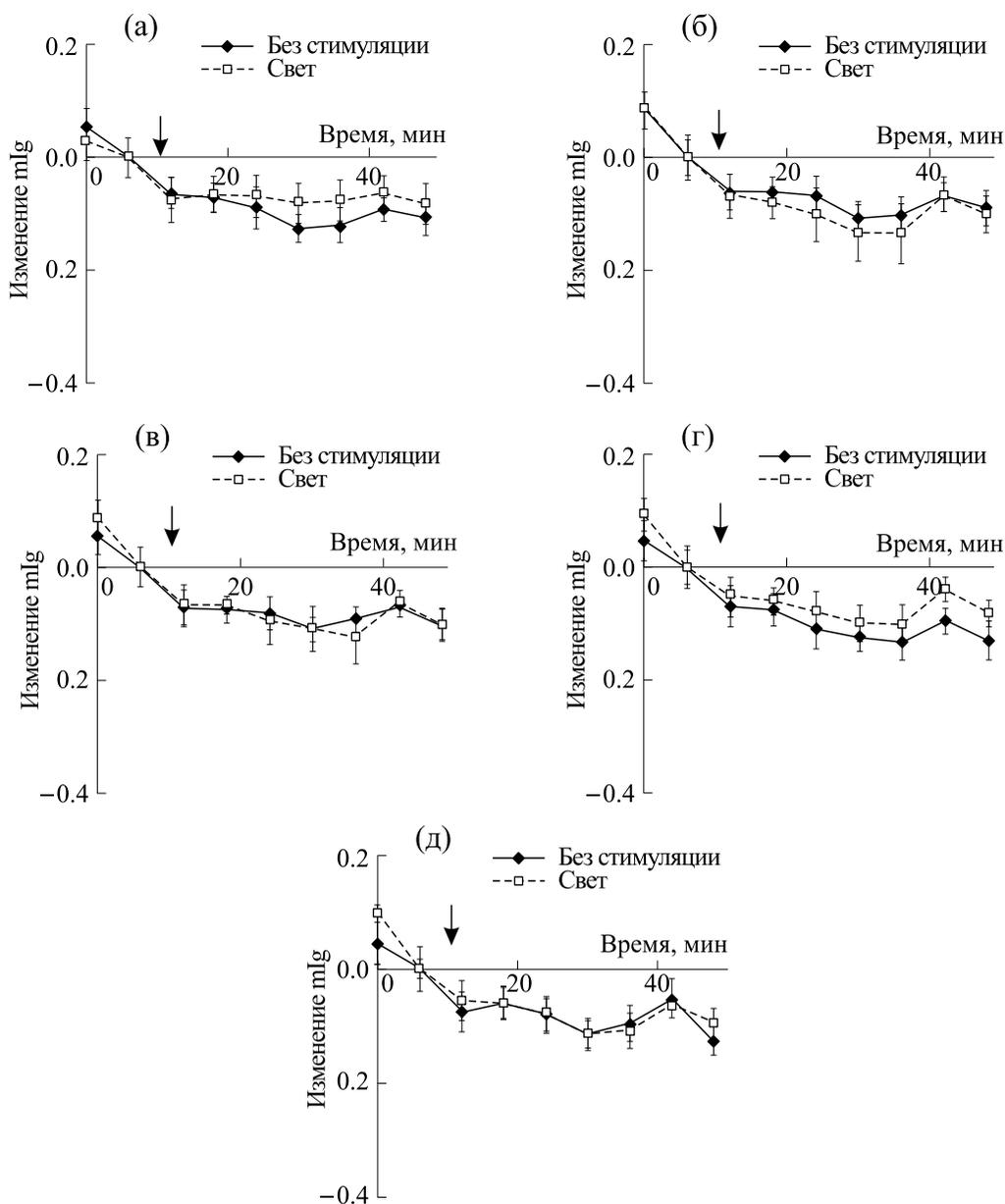


Рис. 6. Влияние локального освещения кончика листа на модифицированный индекс проводимости устьиц листа пшеницы на расстоянии 3 см (а), 5 см (б), 7 см (в), 9 см (г) и 11 см (д) от зоны воздействия стрессора ($n = 8$). Для индукции сигналов использовали только локальное освещение ($540 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, синий свет), которое действовало в течение 10 мин. Листья, подверженные воздействию стрессора, и листья без стимуляции измеряли одновременно. Для анализа использовали изменения mIg по отношению к уровню до воздействия. Стрелкой показан момент начала стимуляции.

Исследование ответов транспирации показало, что локальное освещение не вызывало статистически значимых изменений mIg (рис. 6), более того, отсутствовала даже тенденция к появлению различий между вариантами со стимуляцией и без нее.

Отдельное действие локального нагрева также слабо влияло на модифицированный индекс устьичной проводимости (рис. 7). Наблюдалось

лишь небольшое снижение mIg , которое не имело статистически значимого характера.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе текущего исследования результаты можно разделить на две группы, включая 1) — оценку связи модифицированного индекса проводимости устьиц (mIg) с содержанием воды и проводимостью устьиц; 2) — исследование

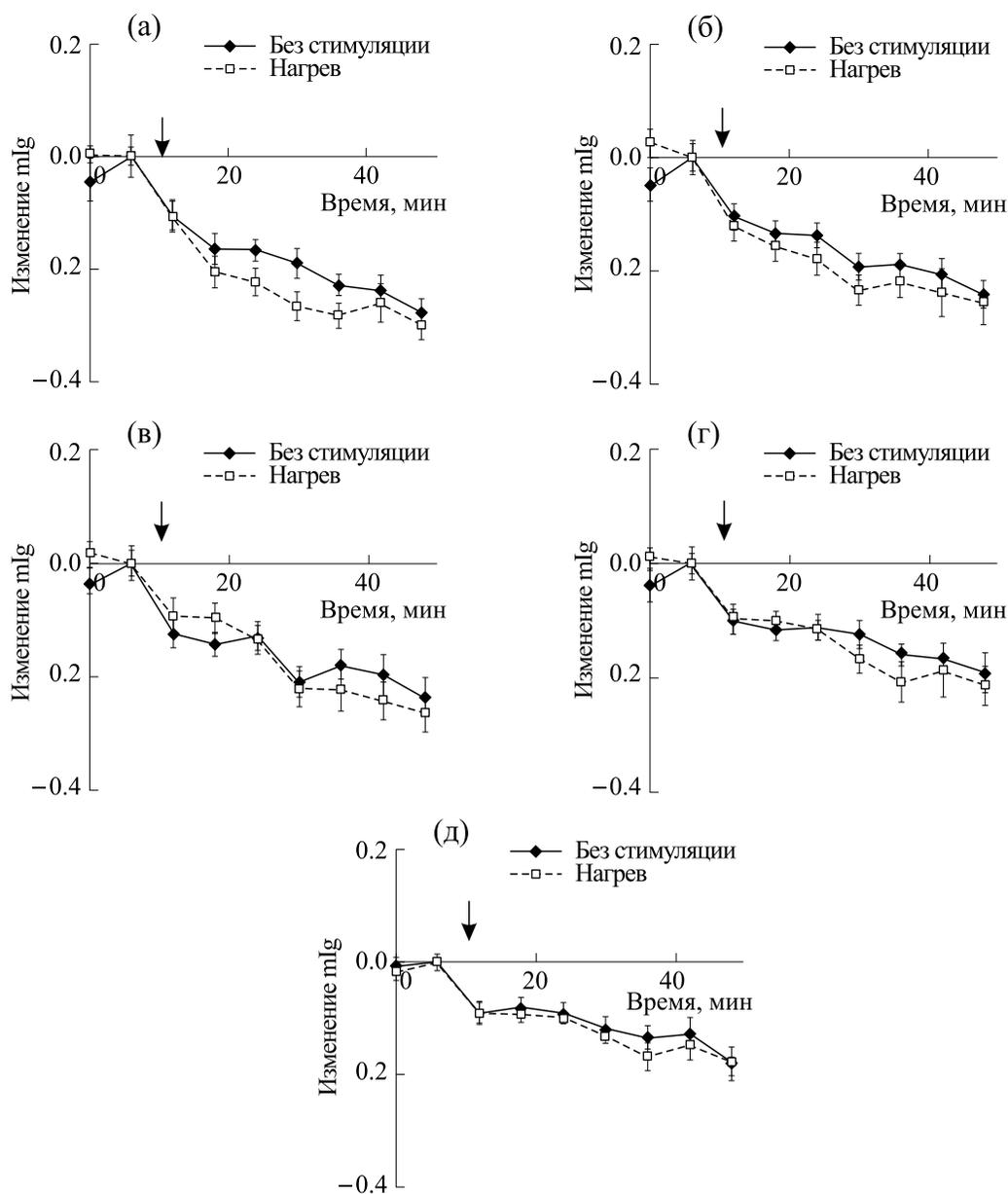


Рис. 7. Влияние локального нагрева кончика листа на модифицированный индекс проводимости устьиц листа пшеницы на расстоянии 3 см (а), 5 см (б), 7 см (в), 9 см (г) и 11 см (д) от зоны воздействия стрессора ($n = 8$). Для индукции сигналов использовали только нагрев до конечной температуры, равной приблизительно 40°C , тепловое воздействие на растение продолжалось до конца эксперимента. Листья, подверженные воздействию стрессора, и листья без стимуляции измеряли одновременно. Для анализа использовали изменения mIg по отношению к уровню до воздействия. Стрелкой показан момент начала стимуляции.

влияния локального воздействия стрессоров на изменения проводимости устьиц на разных расстояниях от стрессированной зоны.

Наши эксперименты показали, что mIg имеет положительную корреляцию ($R > 0.7$, $p < 0.05$) с величинами относительного содержания воды в листьях (рис. 3а) и их водной проводимости (рис. 3б), т.е. снижение mIg свидетельствует об уменьшении RWC и G . Отдельно следует отметить вы-

сокую чувствительность mIg к изменениям относительного содержания воды, так как значительное уменьшение такого индекса наблюдается при изменениях RWC в пределах 3%. Такие результаты хорошо согласуются с литературными данными [5, 6] и показывают, что mIg , рассчитываемый на основании температуры листа, сухого и влажного стандартов, может быть использован для дистанционной оценки проводимости устьиц листьев растений.

Следует отметить, что вызванное локальным действием умеренного нагрева и освещения снижение проводимости устьиц, которое хорошо согласуется с литературой [20], представляется более вероятным механизмом уменьшения mI_g . С другой стороны, представляется маловероятным, что при локальном действии умеренного нагрева и освещения за 45 мин измерения происходит снижение RWC на 2–3% (потребовалась неделя отсутствия полива, чтобы уменьшить относительное содержание воды на 3%). С другой стороны, закрытие устьиц может приводить к уменьшению транспорта воды из корня в лист, что, возможно, достаточно быстро снижает RWC.

Наши данные показывают, что комбинированное локальное воздействие света и нагрева вызывало более сильные изменения модифицированного индекса проводимости устьиц по сравнению с вариантом без стимуляции (рис. 4). В случае воздействия света или нагрева по отдельности такого эффекта не наблюдалось (рис. 6, 7). Интересно, что при умеренной засухе (7 суток) эффект комбинированного воздействия света и нагрева исчезал (рис. 5). В нашей предыдущей работе [17] было показано, что комбинированное локальное воздействие света и нагрева вызывало изменение фотосинтеза на расстоянии от места стимуляции (возрастание нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, снижение квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II); также этот эффект сохранялся в условиях воздействия умеренной засухи. Локальное воздействие нагрева вызывало схожий ответ фотосинтеза на расстоянии от места стимуляции, как и комбинированное локальное воздействие. Напротив, локальное освещение такого влияния на растения не оказывало. В соответствии с выдвинутой нами ранее гипотезой, локальное комбинированное воздействие умеренного нагрева и освещения или отдельный умеренный нагрев вызывает появление гидравлической волны, которая индуцирует электрические сигналы [16, 21]. При этом основным индуктором реакции является локальное нагревание. Распространение электрических сигналов модифицирует активность фотосинтеза [17], что подтверждается сходными изменениями электрических сигналов и фотосинтетических ответов при различных экспериментальных условиях (различные стимулы, наличие или отсутствие засухи).

Полученные в текущей работе результаты показали, что комбинированное воздействие стимулов было необходимо для изменения активности устьиц, однако по отдельности они не оказывали влияния. Это является интересным

эффектом, требующим дальнейшего исследования природы стрессовых сигналов, влияющих на проводимость устьиц; однако, такой результат является скорее аргументом против непосредственного участия электрических сигналов в развитии транспирационного ответа, так как электрические сигналы формируются и при отдельном действии локального нагрева.

Еще одним важным результатом является отсутствие ответов устьиц на комбинированное действие нагрева и освещения в условиях умеренной засухи (электрические сигналы в этих условиях также распространяются, и фотосинтетические ответы развиваются [17]). Однако этот эффект может быть результатом низкого исходного уровня проводимости устьиц в условиях засухи; в этом случае стимуляция растения и распространение сигналов могли не оказывать заметного влияния на проводимость устьиц вследствие их исходной закрытости.

Стоит отметить, что вызванное локальным воздействием света и нагрева изменение mI_g (рис. 4) в интактной зоне было принципиально похоже на ответы транспирации, вызванные варибельным потенциалом при стимуляции растений экстремальными раздражителями (ожог, нагрев до 55–60°C) [20, 22]. Также особенности фотосинтетических ответов, вызванных гиперполяризационными сигналами [17, 21], согласуются с фотосинтетическими ответами, которые показаны в ряде работ, посвященных исследованию вызванных ожогом электрических сигналов [23, 24].

Таким образом, полученные в данном исследовании результаты показывают меньшую взаимосвязь между электрическими сигналами и изменениями водного обмена, нежели с изменениями фотосинтеза. Такой результат также соответствует отдельным работам, выполненным с использованием стандартных стимулов (ожог) для индукции электрических сигналов [25], которые показывают, что изменения водного обмена могут быть не связаны с распространением электрических сигналов.

Из литературы известно, что дистанционные стрессовые сигналы могут иметь различные механизмы и тесно взаимосвязаны друг с другом. В частности, распространение электрических сигналов происходит совместно с передачей волн АФК и Ca^{2+} [26], продукцией стрессовых фитогормонов [27], с распространением гидравлических волн [28] или с передачей комбинированного гидравлического и химического сигналов [29, 30]. Учитывая отмеченное, можно предположить,

что выявленный ответ модифицированного индекса проводимости устьиц связан именно с гидравлическими сигналами, распространяющимися по растению, так как такие сигналы могут, по-видимому, влиять на открытость устьиц в листьях и, как следствие на транспирацию [25]. В свою очередь, вследствие связи гидравлического и электрического сигналов (см., например, работу [28]) это предположение объясняет сходство распределения изменений водного обмена с параметрами распространения электрических сигналов по растению. Такая гипотеза также согласуется с данными о том, что изменение давления, которое может индуцировать распространение гидравлической волны к интактным частям листа, тесно связано с электрическими сигналами [21].

В целом полученные результаты показывают, что локальное действие умеренных стрессоров (комбинация нагрева и освещения) приводит к снижению параметров водного обмена (mIg и, возможно, RWC) на расстоянии от зоны воздействия. При этом по отдельности локальный нагрев или освещение не оказывали такого эффекта. Нами было предположено, что выявленный эффект связан скорее с гидравлическими, нежели с электрическими сигналами. Кроме того, в условиях умеренной засухи влияние комбинации нагрева и света на mIg в интактных зонах также исчезало, что связано с закрытостью устьиц.

ВЫВОДЫ

Результаты наших исследований можно разделить на две группы. К первой группе можно отнести связь модифицированного индекса проводимости устьиц на основе тепловизионных измерений с водной проводимостью устьиц и относительным содержанием воды. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными.

В рамках второй группы результатов, было впервые показано, что локальное действие комбинации умеренного нагрева и освещения приводило к снижению параметров водного обмена (mIg и, возможно, RWC) на расстоянии от места стимуляции. Однако действие только локального нагрева или света такого эффекта не вызвало. Выявленный ответ был вероятно слабо связан с распространением электрических сигналов, участие гидравлических сигналов в его индукции представляется более вероятным. Также важным результатом является то, что влияние комбинированного воздействия нагрева и света на проводимость устьиц исчезало в условиях засухи, что, по-видимому, связано с их исходной закрытостью в этих условиях.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы участвовали в формулировке концепции статьи, подготовке материала и написании черновика статьи. Л.М. Юдина осуществляла итоговое редактирование текста статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10088).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daryanto S., Wang L., and Jacinthe P. A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS One*, **11** (5), e0156362 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0156362
2. Khan S., Anwar S., Yu S., Sun M., Yang Z., and Gao Z. Q. Development of drought-tolerant transgenic wheat: Achievements and limitations. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (13), 3350 (2019). DOI: 10.3390/ijms20133350
3. Sallam A., Alqudah A. M., Dawood M. F. A., Baenziger P. S., and Börner A. Drought stress tolerance in wheat and barley: Advances in physiology, breeding and genetics research. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (13), 3137 (2019). DOI: 10.3390/ijms20133137
4. Kior A., Sukhov V., and Sukhova E. Application of reflectance indices for remote sensing of plants and revealing actions of stressors. *Photonics*, **8** (12), 582 (2021). DOI: 10.3390/photonics8120582
5. Jones H. G. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling. *Agricultural Forest Meteorol.*, **95** (3), 139–149 (1999). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(99)00030-1)
6. Jones H. G., Serraj R., Loveys B. R., Xiong L., Wheaton A., and Price A. H. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.*, **36** (11), 978–989 (2009). DOI: 10.1071/fp09123
7. Helander J. D., Vaidya A. S., and Cutler S. R. Chemical manipulation of plant water use. *Bioorg. Med. Chem.*, **24** (3), 493–500 (2016). DOI: 10.1016/j.bmc.2015.11.010
8. Tardieu F., Simonneau T., and Muller B. The physiological basis of drought tolerance in crop plants: A sce-

- nario-dependent probabilistic approach. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **69**, 733–759 (2018). DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040218
9. Priya M., Dhanker O. P., Siddique K. H. M., Hanumantha Rao B., Nair R. M., and Pandey S. Drought and heat stress-related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. *Theor. Appl. Genet.*, **132** (6), 1607–1638 (2019). DOI: 10.1007/s00122-019-03331-2
 10. Shah J. and Zeier J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.*, **4**, 30 (2013). DOI: 10.3389/fpls.2013.00030
 11. Huber A. E. and Bauerle T. L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: The gap in knowledge. *J. Exp. Bot.*, **67** (7), 2063–2079 (2016). DOI: 10.1093/jxb/erw099
 12. Sukhov V., Sukhova E., and Vodeneev V. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **146**, 63–84 (2019). DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009
 13. Fromm J. and Lautner S., Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ.*, **30** (3), 249–257 (2007). DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x
 14. Sukhov V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth. Res.*, **130** (1–3), 373–387 (2016). DOI: 10.1007/s11120-016-0270-x
 15. Szechyńska-Hebda M., Lewandowska M., and Karpiński S., Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. *Front. Physiol.*, **8**, 684 (2017). DOI: 10.3389/fphys.2017.00684
 16. Yudina L., Sukhova E., Popova A., Zolin Y., Abasheva K., Grebneva K., and Sukhov V. Local action of moderate heating and illumination induces propagation of hyperpolarization electrical signals in wheat plants. *Front. Sustainable Food Syst.*, **6**, 1153731 (2023). DOI: 10.3389/fpls.2023.1153731
 17. Yudina L., Sukhova E., Popova A., Zolin Y., Abasheva K., Grebneva K., and Sukhov V. Hyperpolarization electrical signals induced by local action of moderate heating influence photosynthetic light reactions in wheat plants. *Front. Plant Sci.*, **14**, 1153731 (2023). DOI: 10.3389/fpls.2023.1153731
 18. Пикуленко М. М. и Булычев А. А. Запускаемые светом потенциалы действия и изменения квантовой эффективности фотосистемы II в клетках *Anthoceros*. *Физиология растений*, **52** (5), 660–666 (2005). DOI: 10.1007/s11183-005-0087-5, EDN: HSGOFJ
 19. Szechyńska-Hebda M., Kruk J., Górecka M., Karpińska B., and Karpiński S. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22** (7), 2201–2218 (2010). DOI: 10.1105/tpc.109.069302
 20. Sukhov V. and Sukhova E. Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium. *Planta*, **235** (4), 703–712 (2012). DOI: 10.3390/rs11070810
 21. Yudina L., Popova A., Zolin Y., Sukhova E., and Sukhov V. Local action of increased pressure induces hyperpolarization electrical signals and influences photosynthetic light reactions in wheat plants. *Plants*, **12** (13), 2570 (2023). DOI: 10.3390/plants12132570
 22. Hlaváčková V., Krchnák P., Naus J., Novák O., Spundová M., and Strnad M. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta*, **225** (1), 235–244 (2006). DOI: 10.1007/s00425-006-0325-x
 23. Grams T.E., Lautner S., Felle H. H., Matyssek R., and Fromm J. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant Cell Environ.*, **32** (4), 319–326 (2009). DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01922.x
 24. Sukhova E., Mudrilov M., Vodeneev V., and Sukhov V. Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea. *Photosynth. Res.*, **136** (2), 215–228 (2018). DOI: 10.1007/s11120-017-0460-1
 25. Юдина Л. М., Шерстнева О. Н., Мысягин С. А., Воденеев В. А. и Сухов В. С. Влияние локального повреждения на транспирацию листьев гороха посеянного при различной влажности воздуха. *Физиология растений*, **66** (1), 58–65 (2019). DOI: 10.1134/S0015330319010160
 26. Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A. and Shulaev V. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.*, **2** (84), ra45 (2009). DOI: 10.1126/scisignal.2000448
 27. Hlavinka J., Nožková-Hlaváčková V., Floková K., Novák O., and Nauš J. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pre-treated by ABA. *Plant Physiol Biochem*, **54**, 89–96 (2012). DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.02.014
 28. Stahlberg R., Cleland R.E., and Van Volkenburgh E. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In *Communications in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*, Ed. by F. Baluska, S. Mancuso, and D. Volkmann, (Berlin, Springer, 2006), pp. 291–308. DOI: 10.1007/978-3-540-28516-8_20
 29. Malone M. Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. *New Phytol.*, **128** (1), 49–56 (1994). DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb03985.x
 30. Vodeneev V., Akinchits E., and Sukhov V., Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signal. Behav.*, **10** (9), e1057365 (2015). DOI: 10.1080/15592324.2015.1057365

The Influence of a Combination of Local Moderate Heating and Lighting on the Indicators of Water Metabolism of Intact Parts of Wheat Based on Thermal Imaging

A.Yu. Popova*, Yu.A. Zolin*, V.S. Sukhov*, E.M. Sukhova*, and L.M. Yudina*

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, 603022 Russia

Natural stress factors can lead to yield loss, but when they act locally, stress signals spread, modifying the physiological state and enhancing stress resistance in plants. The purpose of the work is to study the influence of a combination of local factors on indicators of water exchange during irrigation and drought. Wheat was grown in a grow room; drought stress was induced by stopping watering. The modified index of stomatal conductance measured by a thermal camera, leaf water conductivity, and relative leaf water content were used to assess water exchange. It was shown that the conductance index decreased under drought and had strong correlation with plant water status parameters ($R > 0.7$, $p < 0.05$). When the plants were watered using a combination of local factors, this led to a decline in the conductance index value versus the one obtained without a stimulus; the response became weaker with increasing distance from the stimulation zone. Soil drought stress reduced the amplitude of index changes. Exposure to local heating or lighting separately did not cause changes in the index of stomatal conductance. The results show that a combination of local heating and lighting stimulates stress signals that reduce water metabolism in wheat. Potentially, such signals may take the form of the electrical signals; however, the lack of changes in the index of stomatal conductance during drought using only local heating does not support this hypothesis.

Keywords: local heating; local lighting, stress signals, modified index of stomatal conductance, drought, wheat

ПОДВОДНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРОВ ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА В СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ ВОДОЕМАХ БЕЛОМОРСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАК КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА ФОТОТРОФОВ В ЗОНЕ ХЕМОКЛИНА

© 2024 г. Е.А. Лабунская*.,# , Д.А. Воронов** , В.И. Лобышев*** , Е.Д. Краснова*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,
Большой Каретный пер., 19/1, Москва, 127051, Россия

*** Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119992, Россия

#E-mail: styxelenalab@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Измерения спектрального состава света на границе фотической зоны в семи прибрежных водоемах, в разной степени изолированных от моря, на морской акватории и в пресном озере показали, что в морских и солоноватых водоемах до нее доходит преимущественно зеленый свет, а в озерах с пресным верхним слоем — оранжевый, красный и дальний красный. В меромиктических водоемах фотическая зона была ограничена окрашенной прослойкой воды с массовым развитием фототрофных микроорганизмов. Их пигментный состав хорошо согласуется со спектральным составом проходящего света. В морских бухтах и лагунах доминировали таксоны, обладающие красными пигментами: криптофитовые водоросли с фикоэритрином-545, либо пурпурные серные бактерии с каротиноидом океноном, либо коричнево-окрашенные зеленые серные бактерии с изорениератином и бактериохлорофиллом *e*. В озерах с пресным верхним слоем воды развивались одноклеточные водоросли либо зеленые серные бактерии с хлоробактином и бактериохлорофиллом *d*. Спектральный диапазон может служить селективным фактором, определяющим состав сообщества фототрофов со структурно различными антеннами, но схожими спектрами поглощения света.

Ключевые слова: меромиктические водоемы, световые условия, цветение водорослей, аноксигенные фототрофные бактерии, спектры поглощения света, глубинный максимум хлорофилла.

DOI: 10.31857/S0006302924030188, EDN: OEDMLX

Основу каждой экосистемы составляет первичная продукция, в большинстве случаев возникающая в результате фотосинтеза. В водных экосистемах эффективность фотосинтеза зависит от световых условий, которые обычно оцениваются как плотность фотонного потока в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм (фотосинтетически активная радиация — ФАР). Захват фотонов разных длин волн обеспечивают различные антенные комплексы: фикобилисомы, светособирающие

комплексы фотосистем I и II, антенны криптофитовых, FCP-антенны диатомей [1–3]. Они включают такие пигменты, как хлорофиллы (Хл), каротиноиды и фикобилины. Водоросли, благодаря разнообразию их пигментного состава, могут занимать экологические ниши с различными световыми условиями. Различные пигменты избирательно поглощают свет с разными длинами волн. Однако при анализе факторов среды, от которых зависит пространственное распределение и физиологическое состояние водорослей, спектральный состав проходящего света учитывается редко.

Способностью к фотосинтезу обладают также многие бактерии, в том числе осуществляющие фотоокисление сероводорода в анаэробных усло-

Сокращения: ФАР — фотосинтетически активная радиация, Хл — хлорофилл, РОВ — растворенное органическое вещество, ХК — хемоклин, ЗСБ — зеленые серные бактерии, ПСБ — пурпурные серные бактерии, ОВП — окислительно-восстановительный потенциал, Бхл — бактериохлорофилл, Бфео — бактериофеофитин.

виях с выделением не кислорода, а серы – аноксигенные фототрофные бактерии. Некоторые из них приспособлены к поглощению дальней красной части за пределами ФАР. Поэтому для характеристики среды обитания и ее пригодности для первичных продуцентов важно учитывать спектральный состав проходящего света в более широком диапазоне длин волн.

Для объяснения таксономической структуры и распределения фототрофных организмов в различных водоемах, включая моря и пресные воды, в 2007 г. была предложена и использована идеология цветных ниш [4]. В зависимости от концентрации растворенного органического вещества (РОВ), которое поглощает коротковолновую часть спектра света, реализуется одна из пяти цветных ниш: фиолетовая, синяя, зеленая, оранжевая и красная, дискретность которых связана с наличием плеч в спектре поглощения света чистой водой, вызванных колебаниями молекул воды. Их существование было подтверждено с помощью математического моделирования в статье, опубликованной в 2021 г. в журнале «Nature» [5]. В водных акваториях с низким содержанием РОВ, особенно в тропических районах океана с очень прозрачной водой, фиолетовая и синяя части спектра лучше всего проникают на глубину, в то время как красная поглощается водой. В районах с высокой концентрацией РОВ реализуются длинноволновые цветные ниши.

Особенно перспективна концепция цветных ниш для объяснения разноцветных прослоек воды в хемоклине меромиктических водоемов. Такие прослойки обнаружены в большинстве прибрежных меромиктических водоемов, образовавшихся путем отделения от Белого моря в результате поднятия береговой линии [6, 7]. Эти водоемы состоят из нескольких слоев воды с разной минерализацией. При изоляции от моря поверхностный слой воды в них постепенно опресняется, но в нижней части озерной чаши сохраняется реликтовая морская вода. Из-за деятельности бактерий-сульфатредукторов в придонной зоне накапливается сероводород [8]. В градиентной зоне между аэробными и анаэробными условиями, именуемой хемоклином (ХК), нередко в массе размножается какой-либо вид фототрофных микроорганизмов из числа водорослей, цианобактерий или фотосинтезирующих серных бактерий, аналогичный глубинному максимуму хлорофилла [9, 10]. В водоемах, которые находятся на начальных стадиях изоляции от моря, окрашенные прослойки имеют, как правило, красноватые оттенки, а в более изолированных – зеленый цвет.

Цель исследования: охарактеризовать световые условия в хемоклине прибрежных водоемов, в разной степени изолированных от моря, и сопо-

ставить пигментный состав фототрофных микроорганизмов, доминирующих в хемоклине, со спектром проходящего света.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованные водоемы. Световые условия изучали в семи водоемах, в разной степени изолированных от Белого моря, а также на прибрежной морской акватории и в пресном озере. Все водоемы расположены на Карельском берегу Белого моря в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ имени М.В. Ломоносова, самые дальние разделены расстоянием около 32 км.

Морская точка исследований находится в проливе Великая Салма непосредственно возле биостанции (66°33'16''С, 33°5'40''В).

Самую раннюю стадию изоляции от моря представляет ковшовая губа Лобаниха на южном берегу острова Великий, принадлежащего Кандалакшскому государственному природному заповеднику (66°33'23''С, 33°14'11''В). Она подробно описана ранее [11, 12]. Это морской водоем с приливными колебаниями, аналогичными таковым в море, выраженной летней термохалинной стратификацией и периодической придонной аноксией в летнее время. В момент исследования в июне 2023 г. вся толща воды была обеспечена растворенным кислородом, его концентрация убывала от поверхности, где она соответствовала 100% насыщению, к придонной зоне (4.8 мг/л, 35% насыщения).

Другая морская ковшовая губа, именуемая бухтой Биофильтров (66°32'22''С, 33°10'7''В), характеризуется устойчивой вертикальной стратификацией, которая сохраняется круглогодично, и постоянной аноксией зоной [13, 14]. ХК часто окрашен в красноватый цвет из-за массового размножения аноксигенных фототрофных бактерий – пурпурных серных бактерий (ПСБ) либо коричнево-окрашенной формы зеленых серных бактерий (ЗСБ).

Следующая стадия изоляции представлена двумя лагунами. Лагуна на Зеленом мысе (66°31'50''С, 33°5'43''В) заполнена соленой водой. Она сообщается с морем через узкий каменный порог, по которому на максимуме прилива поступает небольшое количество морской воды, из-за чего в лагуне есть небольшие приливно-отливные колебания. В донном углублении лагуны вода содержит сероводород [8], на верхней границе его распространения в летнее время образуется прослойка воды красного цвета с цветением криптофитовых водорослей *Rhodomonas* [9, 10, 15] и коричнево-окрашенных ЗСБ [16, 17].

У другой соленой лагуны под названием «Озеро Кисло-Сладкое» (66°32'54''С, 33°8'6''В) изолирующий порог выше, и забросы морской воды

происходят несколько раз в месяц при высоких сизигийных приливах. На границе аэробной и анаэробной водных масс в ХК размножаются криптофитовые жгутиконосцы *Rhodomonas*, под ними иногда существует слой с ПСБ. В отдельные годы поздней осенью или зимой забросы большого количества воды из моря могут нарушать меромиксию, и на следующий год в ХК этого водоема развиваются только ПСБ [7, 10, 18, 19].

Озеро Большие Хрусломены (66°42'60''С, 32°51'35''В) представляет собой результат искусственной изоляции при попытке превратить морской залив в пресный водоем путем надстройки естественной валунной перемычки. В нем еще есть приливные колебания с амплитудой около 40 см, но поверхностный слой воды опреснен до 4–8‰, что соответствует солоноватому водоему, глубже 2.5 м соленость возрастает и ниже 7 м достигает значений, характерных для беломорской воды. Результатом неполной изоляции стало появление анаэробной зоны, граница которой в летнее время находится примерно на глубине 4 м [20]. В ХК этого озера вода имеет красно-коричневый цвет, связанный с бактериями *Chlorobium phaeovibrioides*, представленными здесь смесью зелено- и коричнево-окрашенной форм [21, 22]. Кроме того, в ХК ежегодно возникает цветение криптофитовых водорослей *Rhodomonas*.

Дальнейший подъем изолирующего порога приводит к усилению изоляции и полному опреснению поверхностного слоя воды при том, что ниже сохраняется вода с морской соленостью. На этой стадии находится озеро Еловое (или «Еловый наволок», 66°28'55''С, 33°16'47''В): в нем верхний слой воды толщиной 1 м пресный, ниже вода соленая, а глубже 3 м – с сероводородом [8]. В ХК этого водоема присутствует слой с ЗСБ, представляющими собой смесь зелено- и коричнево-окрашенной культур *Ch. phaeovibrioides* [10].

Следующим в типологическом изоляционном ряду стоит озеро Трехцветное (66°35'33''С, 32°58'44''В), в котором граница сероводорода поднялась еще выше – к глубине 2 м, и совпадает с галоклином [23, 24]. В ХК этого водоема существует мутно-зеленый жидкий бактериальный мат с высокоплотной популяцией зелено-окрашенных ЗСБ [25, 26]. Над бактериальным слоем вплотную к нему нередко возникает цветение одноклеточных водорослей, например, эвгленовых, либо мелких зеленых жгутиконосцев [7, 10, 27].

При условии дальнейшего подъема берега отделившемуся от моря водоему предстоит стать полностью пресным и повторить историю многих пресноводных озер беломорского и баренцево-морского побережья [28–32]. В их числе большое озеро Ругозеро площадью 130 га с максимальной глубиной 10 м, из которого вытекает ручей, впадающий в вершину беломорской Ругозерской гу-

бы возле пос. Пояконда. В этом озере измерения проводили в самой глубокой точке с координатами 66°35'17''С, 32°48'28''В.

Измерения освещенности и спектров света под водой. Освещенность на разной глубине под водой измеряли люксметром LuxLiner LMI-20 (MetroniX, Китай), модифицированным для погружения под воду. По данным этих измерений для каждого водоема в зоне постепенного уменьшения освещенности вычисляли коэффициент вертикального ослабления света $K_d = 1/z \ln(E_0/E_z)$, где E_0 и E_z – освещенность соответственно на поверхности и глубине z , \ln – натуральный логарифм [33]. Для сопоставления величин, измеряемых люксметром, с плотностью потока фотосинтетических фотонов (мкмоль фотонов/м²·с), была проведена калибровка люксметра путем одновременного определения освещенности люксметром и квантометром LI-190 Quantum Sensor (Li-Cor, США). Использовали солнечный свет разной интенсивности, а также набор светофильтров (фиолетовый, синий, зеленый, желтый, красный). Отношение величин люкс/(мкмоль фотонов/м²·с) составило 51.6 ± 3.7 (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 22$).

Измерения спектра проходящего света были выполнены с помощью спектрометра Ocean Optics USB 4000 (Ocean Insight, США), соединенного с компьютером и с погружаемым волоконно-оптическим зондом типа 7×UV200/220/290Al с полосой пропускания 200–1300 нм. Измерения проведены в августе 2022 г. и в июне 2023 г.

Обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Спектры нормировали по максимальному значению, корректировали базовую линию посредством вычитания усредненных значений, соответствующих базовой линии, из всех значений по ординате. При необходимости проводили сглаживание спектров методом скользящего среднего по 9 значениям (в спектрах по 3648 точек). В каждом водоеме для света, проходящего к ХК, были определены границы спектрального диапазона (минимальная и максимальная длины волн, при которых интенсивность сигнала в относительных единицах не превышала значения для базовой линии с учетом шума), полуширина (ширина на уровне половины высоты сглаженного максимума спектра), а также середина спектрального максимума. Ее определяли, как середину интервала, параллельного оси абсцисс, между левой и правой ветвями спектральной кривой, в области, не осложненной шумами и максимально приближенной к вершине спектра. Данный параметр взят вместо положения максимума спектра из-за возможных посторонних шумов в области вершины, которые могут снизить корректность определения длины волны максимума спектра.

Отбор проб и измерения физико-химических параметров воды. Для анализа пигментов и микрорепродукции отбирали пробы воды погружным насосом Pump GP1352 (Whale, Великобритания) с размеченным кабелем; при точном позиционировании насоса по вертикали можно обеспечить дискретность отбора проб 10 см. Глубину, на которой находится ХК, предварительно оценивали с помощью мультипараметрического зонда YSI PRO (YSI Environmental, США) с датчиками температуры, солености и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) по уровню, на котором происходил переход от положительных значений ОВП (окислительные условия) к отрицательным (восстановительные условия), а также при отборе проб, ориентируясь на цвет воды, наличие запаха сероводорода и дополнительные измерения ОВП в пробе.

Обработка проб. Для идентификации доминирующих микроорганизмов в ХК пробу воды объемом 15 мл концентрировали в 20 раз на центрифуге Eppendorf 5804 в течение 10 мин на скорости 3000 об/мин и просматривали под флуоресцентным микроскопом Leica (Leica Microsystems GmbH, Германия) с набором фильтров N2.1 (возбуждение/пропускание 515–560/580 нм).

Для экстракции пигментов пробы концентрировали в 20–100 раз в зависимости от количества организмов в пробе воды. К осадку добавляли 5–10 мл 90% ацетона и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Супернатант использовали для абсорбционной спектрофотометрии в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 1 см. Для получения спектра поглощения фикоэритрина пигмент экстрагировали из концентрированных проб калий-фосфатным буфером (рН 6.7), применяя для лучшего разрушения клеток и выделения пигмента циклы замораживания-оттаивания и обработку ультразвуком согласно методике, описанной в работе [34]. Спектры поглощения света в полученных экстрактах снимали в диапазоне длин волн 400–900 нм на спектрофотометре PV 1251 (Solar, Беларусь). Полученные спектры обрабатывали: вычитали из всех данных по ординате значение оптической плотности при $\lambda = 850$ нм для поправки на светорассеяние и нормировали на величину максимума в красной области спектра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подводная освещенность. По данным измерений освещенности под водой глубже всего свет проходил в водоемах с морской водой (рис. 1, табл. 1).

В прибрежной зоне моря освещенность с глубиной уменьшалась постепенно. В поверхностном метре воды терялось 20–35% светового пото-

ка (в среднем 28%). При глубине 14 м, сопоставимой с глубинами других морских водоемов, охваченных исследованиями, до дна доходило около 1% световой энергии, то есть вся водная толща входила в эвфотическую зону. По сравнению с полуизолированными водоемами, вода в море лучше пропускает свет и характеризуется наименьшим коэффициентом вертикального ослабления света K_d (табл. 1).

В ковшовой губе Лобаниха, в которой есть выраженной вертикальной неоднородность по температуре и солености воды, но нет ХК, K_d несколько больше, чем в море. Глубины 14 м в ней достигало лишь 0.2% проникающего под воду света.

По мере усиления изоляции водоема от моря оптическая плотность воды возрастала. В лагуне на Зеленом мысе ослабление света верхним метровым слоем воды составляло 28–58% от светового потока на поверхности воды; в оз. Кисло-Сладкое – 54–64%, в оз. Б. Хрусломены – 53–82%, в оз. Еловое – 73–94%. В этом ряду величина K_d постепенно возрастала. Все это хорошо согласуется с увеличением цветности воды, видимой глазом. Самая темная вода в оз. Трехцветное из-за высокой концентрации гуминовых веществ, где зарегистрировано самое большое значение K_d , равно 2,88. Высокие значения этого коэффициента характерны для пресных вод в районе исследований, в частности – для другого водоема с пресным миксолимнионом (оз. Еловый Наволок) и для пресноводного оз. Ругозеро.

С появлением ХК профили подводной освещенности существенно меняются. От поверхности до ХК подводная освещенность убывала постепенно и равномерно, а в ХК – резко, и ниже него освещенность была нулевой.

В каждом водоеме наибольшие потери света приходились на зону ХК: в бухте Биофильтров между 7.5 и 8.4 м, в лагуне на Зеленом мысе – между 5.0 и 5.4 м, в оз. Кисло-Сладкое – между 3.0 и 4.0 м, в оз. Б. Хрусломены – между 3.0 и 4.4 м, в оз. Еловое – между 2.0 и 3.0 м, в оз. Трехцветное – между 1.5 и 2.0 м. В изоляционном ряду водоемов граница фотической зоны поднимается от 8.4 м в морской ковшовой бухте Биофильтров до глубины 2 м в озере Трехцветное. В пресноводном водоеме Ругозеро, несмотря на отсутствие ХК, распространение света ограничено глубиной 4 м из-за темного цвета воды, обусловленного высокой концентрацией РОВ.

Доминирующие микроорганизмы в хемоклине. В море, пресноводном озере Ругозеро, а также в губе Лобаниха в период исследований слои с высокой концентрацией фототрофных микроорганизмов не обнаружены.

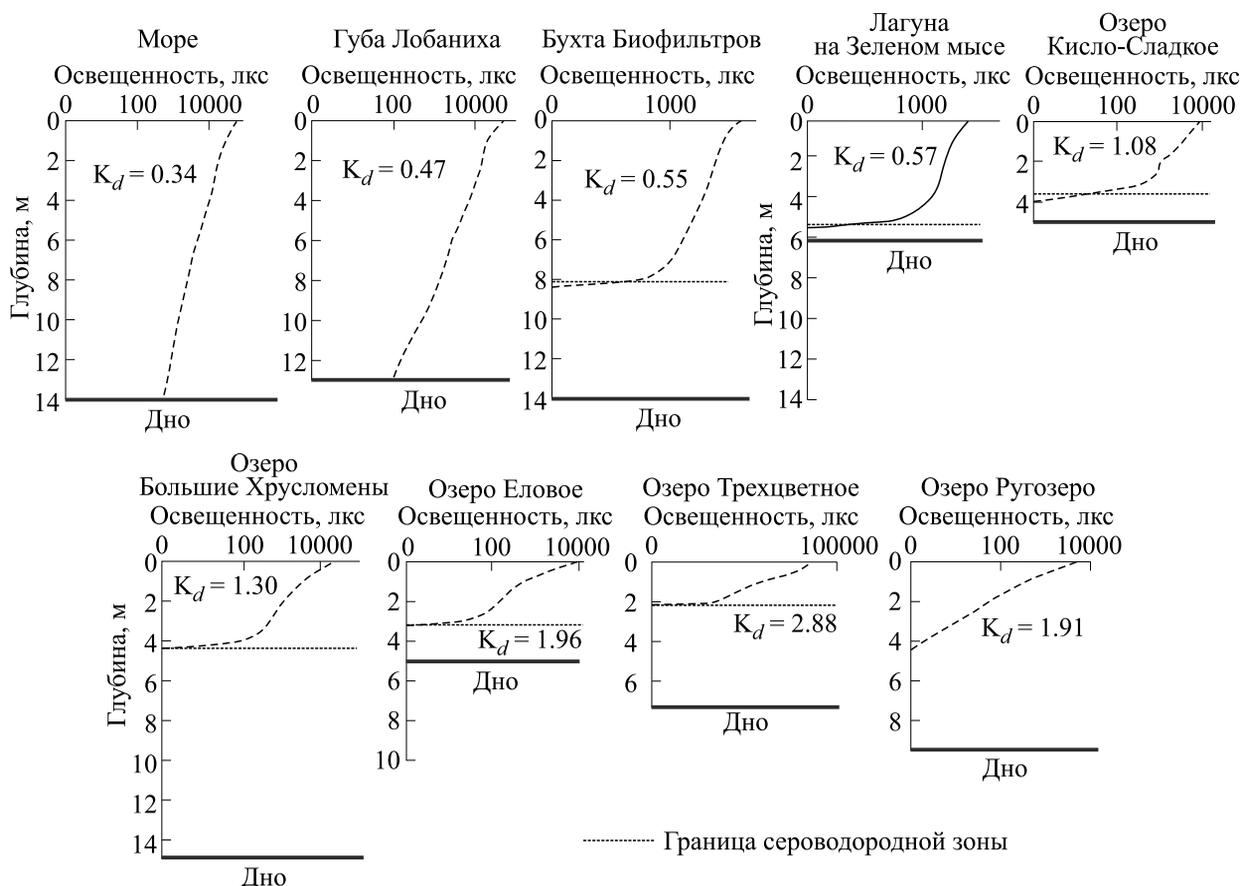


Рис. 1. Профили подводной освещенности в исследованных водоемах. Слева направо усиливается изоляция от моря.

В бухте Биофильтров на глубине 7.0 м в небольшом количестве присутствовали криптофитовые жгутиконосцы *Rhodomonas* sp. и в массе — ПСБ. Ниже, на глубине 7.5 м их количество уменьшилось, появились бактериальные хлопья с коричнево-окрашенными ЗСБ, максимум которых приходился на горизонт 8.0 м.

В лагуне на Зеленом мысе цветной слой состоял из нескольких прослоек: желтой, розовой, «хаки» и коричневой. В зоне 4.5–5.1 м отмечено высокое обилие мелких диатомовых водорослей, мелких жгутиконосцев зеленого цвета и мелких кокков с флуоресценцией, свойственной Хл *a*. На глубине 5,3–5,4 м, уже в сероводородной зоне, мы обнаружили слой красной воды с цветением *Rhodomonas*. Там же появились клетки ПСБ и взвесь из мелких бактериальных клеток коричневого цвета — вероятно, коричнево-окрашенных ЗСБ, которые обычно доминируют в ХК этого водоема.

В оз. Кисло-Сладкое в сезон исследований происходило цветение мелких зеленых жгутиконосцев и цианобактерий, причем количество последних возрастало от поверхности вниз и достигло максимума на глубине 3.1 м. На горизонте

3.1 м к ним добавились гетеротрофные протисты *Ebria tripartita* и криптофиты *Rhodomonas* sp., у последних максимум численности пришелся на горизонт 3.2 м, из-за чего хемоклин был желто-розовым. Там же отмечено множество хищных динофлагеллят *Ocyrrhis marina*, в их клетках были видны останки родомонасов, которыми они питались. Десятью сантиметрами ниже (3.3 м) численность этих динофлагеллят стала еще больше, но *Rhodomonas* почти все были ими съедены. В небольшом количестве живые клетки *Rhodomonas* встречались до глубины 4.0 м, хотя с глубины 3.5 м в воде уже был сероводород, а значения ОВП сигнализировали о сильно восстановительной среде.

В оз. Б. Хрусломены в августе 2023 г. в зоне 3.8–4.1 м концентрировались *Rhodomonas*, максимум их численности пришелся на горизонт 4.0 м. Начиная с горизонта 4.1 м, в пробах во множестве появились бактерии, в том числе пурпурные, и взвесь из одиночных ЗСБ. Переход в сероводородную зону находился на глубине 4.3 м, где вода имела бурый цвет из-за массы ЗСБ. Из-за последовательной смены окрашенных доминантов ХК

Таблица 1. Характеристики водоемов и световые условия в них

Водоем	Глубина водоема, м	Соленость в эпителионе, ‰	Слой с максимальным уменьшением освещенности (хемоклин), м	Глубина, до которой доходит 1% света, м	Коэффициент вертикального ослабления света K_d (m^{-1}) в зоне постепенного уменьшения освещенности
Море	14.0	25.0	нет	14.0	0.34
Губа Лобаниха	14.0	25.0	нет	10.5	0.47
Бухта Биофильтров	14.0	22.0	7.5–8.4	7.6	0.55
Лагуна на Зеленом мысе	6.5	21–23	5.0–5.4	5.0	0.57
Оз. Кисло-Сладкое	4.5	16–21	3.0–4.0	3.4	1.08
Оз. Большие Хрусломены	18.0	4.0	3.0–4.4	4.2	1.30
Оз. Еловый Наволок (Еловое)	5.5	0.3	2.0–3.0	2.7	1.96
Оз. Трехцветное	7.5	0	1.5–2.0	1.5	2.88
Оз. Ругозеро	10.0	0	нет	3.5	1.91

Примечание. Коэффициент вертикального ослабления света $K_d = 1/z \cdot \ln(E_0/E_z)$, где E_0 и E_z – освещенность соответственно на поверхности и глубине z [33].

состоял из прослоек разного цвета: розовой, красной и бурой.

В оз. Еловое начиная с глубины 2.5 м до 3.0 м находился слой с цветением мелких зеленых жгутиконосцев, которые обычно развиваются в ХК этого водоема в летне-осенний период и определяют зеленую окраску соответствующего слоя воды. На горизонте 3.0 м обнаружено скопление *Euglena* sp. С глубины 3.1 м начинается сероводородная зона; вода здесь мутно-бурая от ЗСБ с добавлением очень мелких коккоидных цианобактерий.

В оз. Трехцветное в период исследований в верхней части ХК отмечена высокая численность мелких кокков и жгутиконосцев, а также диатомеи *Cyclotella* sp. С глубины 1.7 м к ним добавились зеленые водоросли *Monoraphidium* sp. и крупные зеленые криптофитовые жгутиконосцы. В слое 1.9–2.0 м наблюдалось цветение жгутиконосцев зеленого цвета с клеткой в форме чашеч-

ки. С глубины 2.1 м началась сероводородная зона и произошла резкая смена на мутно-зеленое высокоплотное сообщество ЗСБ, многократно описанное в предыдущих публикациях об этом водоеме [24–26, 35, 36].

В оз. Ругозеро фитопланктон был довольно обильным и представлен мелкими диатомеями, криптофитовыми жгутиконосцами, зелеными водорослями *Monoraphidium* sp. и золотистыми водорослями *Maalomonas* sp.

Спектральный состав света в хемоклине. Спектр света в водоемах обладает особенностями, связанными с прохождением света сквозь толщу воды. Свет поглощают молекулы воды, причем при увеличении длины волны оптическая плотность возрастает [37], из-за чего красная часть спектра под воду проходит неглубоко. В ультрафиолетовой и синей части спектра ослабление светового потока связано с поглощением света РОВ [4]. Кроме того, интенсивность света и

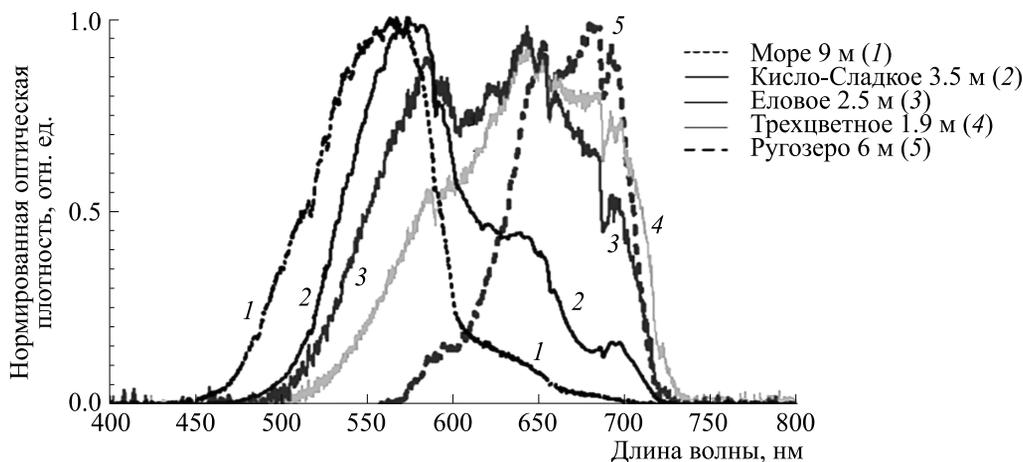


Рис. 2. Спектры солнечного излучения на границе фотической зоны водоемов на разных стадиях изоляции от моря (изоляция усиливается слева направо).

спектральный состав могут меняться при прохождении через горизонты с высокой плотностью фототрофных организмов.

Изменения спектрального состава света при прохождении сквозь толщу воды во всех исследованных нами водоемах имели общие черты. По мере увеличения глубины спектральный диапа-

зон становится меньше, коротковолновая часть спектра обрезается в большей степени, чем длинноволновая, а максимум спектра проходящего света сдвигается в сторону больших длин волн (рис. 2 и 3). Ослабление света в красной и дальней красной частях спектра связано, в основном, с поглощением дальнего красного света молекулами воды. Сдвиг коротковолновой границы, связанный с поглощением синего света РОВ, коррелирует со степенью изоляции водоема от моря и концентрацией РОВ в воде [38].

Фиолетовая часть спектра доходит до границы фотической зоны только в море и в губе Лобаниха. В ХК бухты Биофильтров, лагуны на Зеленом Мысе и оз. Кисло-Сладкое коротковолновый край спектрального диапазона лежит в синей области (рис. 3). В оз. Б. Хрусломены спектральный диапазон света в ХК начинается на границе синей и зеленой области (488 нм).

Смещение длинноволновой границы проходящего света на границе фотической зоны определяется ее толщиной. В оз. Трехцветное глубина фотической зоны составляет 1.5 м (табл. 1), и спектр света, доходящего до ее границы, справа ограничен длиной волны 739 нм. В оз. Еловое на глубине 2.5 м правая граница спектра приходится на 728 нм, в оз. Ругозеро фотическая зона доходит до глубины 3.5 м, и длинноволновая граница проходящего света располагается еще левее (722 нм). В морских водоемах фотическая зона еще больше, и правая граница проходящего света находится в области 710–715 нм.

Полуширина спектра (рис. 3) характеризует область видимого спектра света, на которую приходится большая часть световой энергии на дан-

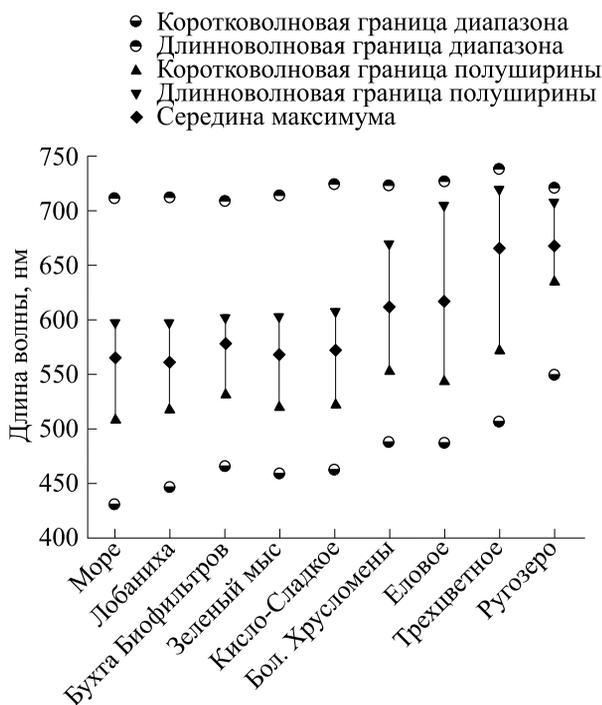


Рис. 3. Параметры спектров проходящего света на границе фотической зоны в ряду водоемов на разных стадиях изоляции от моря (изоляция усиливается слева направо).

ной глубине. Если в море и в губе Лобаниха на границе фотической зоны свет укладывается в зеленую и желтую область (с правым краем на 592 и 593 нм соответственно), то в бухте Биофильтров правая граница полуширины — 598 нм, а в оз. Кисло-Сладкое — 603 нм, то есть в начале оранжевой части спектра. Середина максимума во всех этих водоемах попадает примерно на границу зеленой и желтой частей спектра.

В водоемах с солоноватой и пресной водой границы фотической зоны достигает преимущественно зеленый, желтый, оранжевый и красный свет (границы полуширины спектров находятся в диапазоне 548–713 нм). В ХК озер Б. Хрусломены и Еловое середина максимума спектра находится в оранжевой области (611 и 617 нм), а в оз. Трехцветное — в красной (665 нм). Полуширина у спектров этой группы водоемов больше, чем морских, и может составлять более 100 нм. В пресном оз. Ругозеро граница фотической зоны получает преимущественно красный свет — обе границы полуширины максимума полностью лежат в красном диапазоне спектра.

Таким образом, водоемы типологического изоляционного ряда содержат серию световых ниш, различающихся по границам спектральных диапазонов.

Интересно, что в глубоких слоях пресных водоемов на спектрах проходящего света в диапазоне 600–625 нм наблюдался провал. По форме и расположению он очень похож на депрессию в спектрограмме Холтропа [5], обусловленную плечом в спектре поглощения света чистой водой на длине волны 605 нм. Следовательно, поглощение света на этой и соседних к ней длинах волн связано с оптическими свойствами самой воды. В оз. Трехцветное это проявилось в асимметрии формы спектра со сдвигом середины максимума спектра в длинноволновую сторону (рис. 2). В менее изолированных водоемах максимумы приходились на более коротковолновую часть спектра.

Пигментный состав фототрофов в зоне хемоклина. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов из розового слоя воды в ХК бухты Биофильтров (рис. 4а) обладают пиком в синей области при 468 нм и плечом на 519 нм, а также двумя более слабыми пиками в красной (653 нм) и дальней красной части спектра (770 нм). Отсутствие характерного для фототрофных эукариот и цианобактерий максимума в красной области спектра Хл *a* при 663 нм и наличие вместо него максимума 653 нм указывают на смесь бактериохлорофилла (Бхл) и бактериофеофитина (Бфео) *d* либо *e* [39, 40]. Однако для Бхл или Бфео *d* характерно наличие максимума в фиолетовой области:

424 нм для Бхл и 406 нм для Бфео, что не обнаруживается на полученных нами спектрах. По всей видимости, максимум в красной области спектра экстракта из ХК бухты Биофильтров соответствует антенному Бхл *e* коричнево-окрашенных ЗСБ *Ch. phaeovibrioides* и продукту его деградации Бфео *e*. К этим бактериям относится и пик на 468 нм, совпадающий с максимумом поглощения света антенного каротиноида коричнево-окрашенных ЗСБ изорениератина [41]. Плечо 519 нм соответствует антенному каротиноиду окенону, принадлежащему ПСБ [42], а пик на 770 нм — (Бхл) *a*, входящему в состав реакционного центра и антенны ПСБ [43]. Эти результаты согласуются с определением состава микроорганизмов методом световой микроскопии.

В оз. Кисло-Сладкое в экстрактах из проб зоны ХК, взятых в июле 2022 г. (рис. 4б), выражен сигнал Хл *a*, а при экстракции пигментов фосфатным буфером — пик 549 нм, наиболее близкий к максимуму коротковолнового фикоэритрина-545 (рис. 4б,д). Этими пигментами обладают криптофитовые водоросли из рода *Rhodomonas* [44], обнаруженные нами при микроскопировании. Годом ранее в тот же сезон в этом водоеме доминировали ПСБ с океноном (плечо 521 нм) и Бхл *a*, а также коричнево-окрашенные ЗСБ с Бхл *e*, Бфео *e* и антенным каротиноидом изорениератинном (рис. 4б).

Все это говорит о сходстве таксономического и пигментного состава в сообществах фототрофов в ХК ковшовой губы (бухта Биофильтров) и морской лагуны (оз. Кисло-Сладкое) — слабо изолированных водоемов со схожими спектральными параметрами проходящего в зону ХК света.

В спектрах поглощения ацетоновых экстрактов из ХК оз. Еловое (рис. 4в) заметен пик при 654 нм, характерный для Бхл *d*, либо смеси Бхл и Бфео *e* [39, 40]. Есть еще один пик в синей области на 427 нм, соответствующий полосе Соре Бхл *d*, а также широкое плечо 458–466 нм, которое может свидетельствовать о наличии Бхл *e*, изорениератина и хлоробактина. Анализ пигментов говорит о совместном присутствии двух штаммов ЗСБ *Ch. phaeovibrioides*: зелено-окрашенного и коричнево-окрашенного, что описано в ряде работ [21, 45]. В отличие от оз. Кисло-Сладкое, в ХК оз. Еловое состав фототрофов стабильный в разные годы и сезоны [7, 10], и пигментный состав также, в основном, сохраняет постоянство: меняется лишь соотношение полос поглощения пигментов зелено- и коричнево-окрашенных ЗСБ, что может говорить об изменении долей этих штаммов ЗСБ от года к году (рис. 4в).

Спектры поглощения ацетоновых экстрактов из ХК оз. Трехцветное выявляют наличие Бхл *d* и

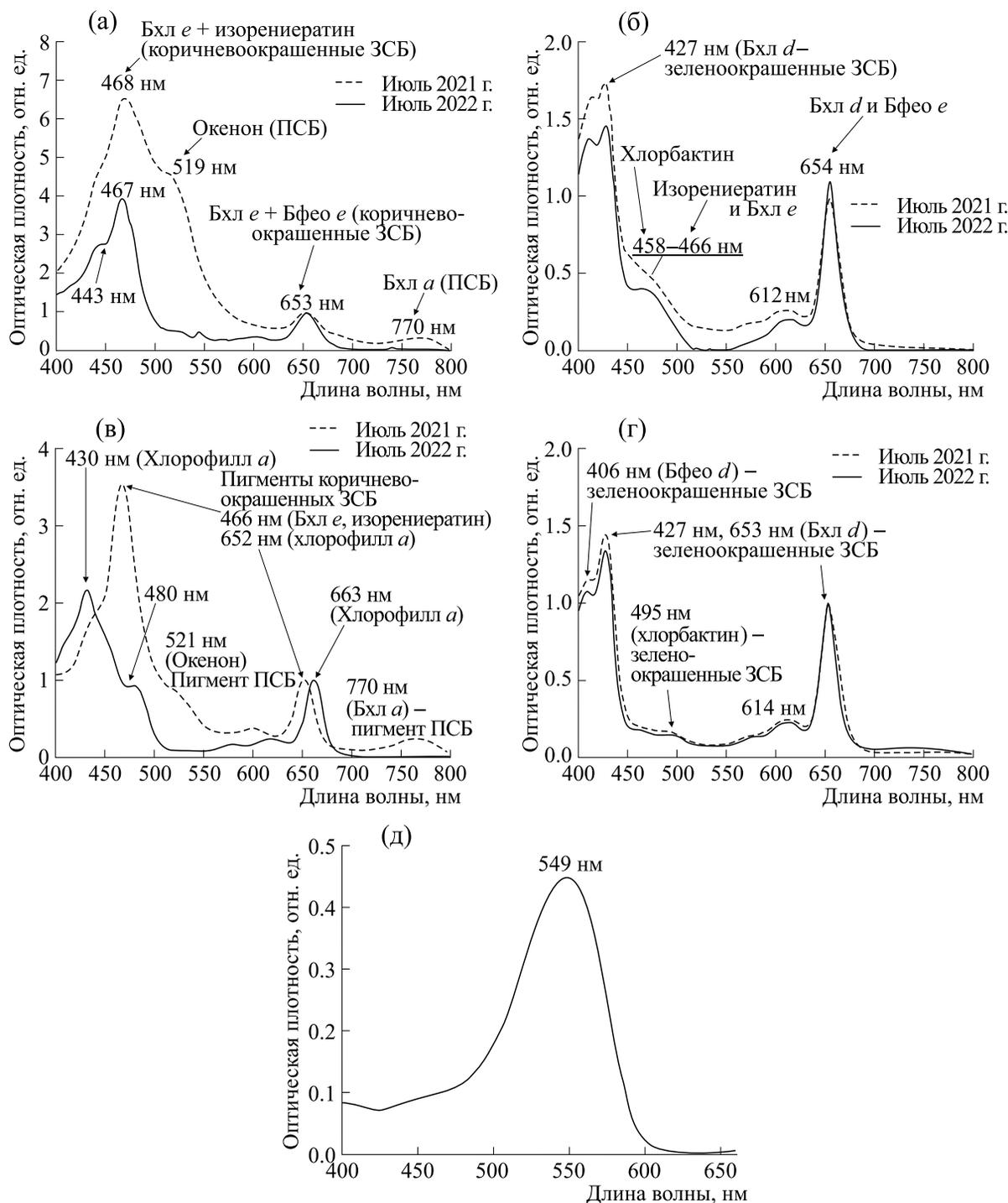


Рис. 4. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов проб из зоны хемоклина бухты Биофильтров (а), оз. Кисло-Сладкое (б), оз. Еловое (в), оз. Трехцветное (г). (д) – Спектр поглощения пробы из зоны хемоклина озера Кисло-Сладкое при экстракции калий-фосфатным буфером (рН 6.7).

Бфео d – об этом свидетельствуют пики на 653, 427 и 406 нм (рис. 4г), что говорит о присутствии зелено-окрашенного штамма *Ch. phaeovibrioides* и было неоднократно описано [25, 26, 35]. Присут-

ствие каротиноида хлоробактина, характерного для зелено-окрашенных бактерий, заметно на спектрах по небольшому плечу в области 495 нм. Состав сообщества фототрофов ХК оз. Трехцвет-

ное отличается высокой стабильностью между сезонами и годами, что было ранее описано [25, 26, 35], а также отражено на рис. 4г.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прибрежные стратифицированные водоемы, отделившиеся от Белого моря, имеют общее происхождение, но различаются по гидрологической структуре и условиям обитания. Их биологические сообщества представляют собой разные стадии сукцессии, которые стартовали из одной экосистемы и отражают приспособление биоты к однонаправленно меняющимся абиотическим факторам, в том числе — к закономерной смене цветковых ниш из-за растущего влияния стока с водосбора и увеличения концентрации РОВ терригенного происхождения при переходе экосистемы из морского состояния к пресноводному через стадию меромиктического водоема с аноксической зоной. Это дало нам возможность изучить приспособительную реакцию сообщества фототрофов из исходно единой по составу биоты, к смене цветковых ниш, в отличие от работы [5], где авторы рассматривают различающиеся по спектральному составу света местообитания в удаленных друг от друга частях Мирового океана.

Измерения освещенности под водой указывают на сокращение фотической зоны по мере усиления изоляции водоема от моря зона. В море и морской губе Лобаниха (без выраженной вертикальной стратификации) свет в диапазоне, измеряемом люксметром, наиболее чувствительным к зеленой части спектра, распространяется до дна; в водоемах с анаэробной зоной он доходит только до ХК, а ниже условия темновые. Это связано с двумя факторами. Во-первых, изоляция водоема сопровождается усилением роли пресного стока, который поступает с водосбора и приносит терригенные гуминовые вещества [46]. Во-вторых, ХК поднимается ближе к поверхности. Взвесь микроорганизмов в ХК поглощает остатки дошедшего до него света и играет роль затеняющего фильтра.

Фототрофные микроорганизмы, обитающие в ХК, существуют в условиях крайне низкой освещенности. На верхней границе ХК освещенность составляет 150–360 лк, что соответствует 3–7 мкмоль фотонов/м²·с. Подобный уровень освещенности встречается в самых затененных наземных растительных сообществах, таких как нижний ярус австралийского тропического дождевого леса, где освещенность составляет около 0.2% от полного дневного света (около 2–3 мкмоль фотонов/м²·с), а выживаемость проростков растений существенно снижена [47]. Наземные растения акклимируются к условиям низкой освещенности, увеличивая долю (светособи-

рающего комплекса фотосистемы II и соответственно снижая отношение Хл *a*:Хл *b* [48, 49]. Поскольку в наземных местообитаниях снижение освещенности практически всегда связано с уменьшением отношения красного света к дальнему красному, фоторецепторы фитохромы, ответственные за восприятие света в этой области спектра, включают механизмы акклимации [50, 51]. К ним относится не только усиление синтеза Хл *b* [52], но и комплекс морфофизиологических признаков, известный как синдром избегания тени [53].

Наземные растения, получая полный спектр видимого света, при необходимости включают механизмы избегания тени либо имеют генетически обусловленные механизмы теневыносливости и не нуждаются в дополнительных антенных пигментах помимо Хл *a*, *b* и каротиноидов. Но фототрофы водных экосистем получают лишь часть спектра видимого света и вынуждены расширять возможности для улавливания света за счет дополнительных пигментов. Красные водоросли обладают фикобилисомами с разными фикобилинами, что позволяет им занимать разные ниши [54], цианобактерии способны акклимироваться, подстраиваясь под спектр доступного света [55]. Показана связь между распределением световых ниш в Мировом океане и набором пигментов в фикобилисомах цианобактерий [56]. Однако далеко не все группы фитопланктона и фототрофных микроорганизмов способны акклимироваться к недостатку света, необходимого для функционирования пигментов реакционных центров фотосистем, и пластично изменять состав фотосинтетических антенн. Поэтому свет, проникающий в зону ХК стратифицированных водоемов, может являться селективным фактором, задающим ограничения на таксономический состав доминирующих в этой зоне фототрофов.

Несмотря на низкую интенсивность света, в ХК этих водоемов водоросли находятся в оптимальном физиологическом состоянии, о чем свидетельствуют высокие показатели эффективности фотосинтеза, определяемые методом быстрых индукционных (ОИР) кривых и по измерениям световых кривых флуоресценции [10, 17, 57, 58]. О высокой фотосинтетической активности обитателей ХК в условиях низкой освещенности известно также из исследования, выполненного на карстовом стратифицированном озере в Испании [59]. Благоприятным фактором может служить доступность биогенных веществ, диффундирующих из анаэробной зоны, где их концентрация очень высока [10], однако высокая функциональная активность фотосинтетического аппарата все равно была бы невозможна без эффективно работающих антенных пигментов. Она достигается благодаря специфическому пиг-

ментному составу, включающему хлорофиллы, каротиноиды и фикобилины.

Для определения спектров пигментов их обычно экстрагируют в полярных растворителях — ацетоне, метаноле, этаноле и др. При этом спектральные характеристики значительно меняются, полосы поглощения смещаются в сторону коротких волн в связи с переходом пигмента из комплексов с белками в мономерную форму. Определение спектральных характеристик отдельных пигментов *in vivo* — непростая задача, таких данных гораздо меньше, они разбросаны по множеству источников. Мы постарались собрать имеющиеся в литературе сведения о максимумах поглощения света *in vivo* пигментов, которые могут входить в состав фитопланктона краевых беломорских водоемов, и массовых видов аноксигенных фототрофных бактерий, полагая, что такая подборка может быть полезна и другим исследователям (табл. 2). Для того чтобы более точно охарактеризовать доступность света для ключевых антенных пигментов, мы нашли нормированные на максимум относительные величины интенсивности прошедшего света, соответствующего максимумам поглощения антенных пигментов (табл. 3).

В спектральных нишах ХК ковшовой губы (бухта Биофильтров) и лагуны (оз. Кисло-Сладкое) актуальным для фототрофов оказывается освоение диапазона от 500 до 700 нм с максимумом около 570–580 нм. В бухте Биофильтров криптофитовые водоросли рода *Rhodomonas*, пик которых в разные годы может быть локализован в микроаэробной части ХК, а также ПСБ, обитающие в ХК ниже редокс-перехода, обладают подходящими для усвоения этого света антеннами: первые — фикобилипротеинами с коротковолновым фикоэритрином (поглощение при 545 нм) и антенным Хл *c2* (638–639 нм) [74], вторые — океноном (около 521 нм) [75]. Основные максимумы Бхл *a*, пигмента антенн ПСБ [43], не попадают в диапазон доступного в ХК света. В анаэробной зоне под ХК коричнево-окрашенная форма *Ch. phaevibrioides* усваивает оставшийся свет при помощи каротиноида изорениератина (505 нм) [70] и плеча Бхл *e* (520 нм). Известно, что бактерии *Chlorobium* адаптированы к усвоению очень низких интенсивностей света [76] и осуществляют фотохимические реакции практически в афотической зоне. В ХК оз. Кисло-Сладкое так же, как и в бухте Биофильтров, доминируют криптофитовые водоросли *Rhodomonas* либо ПСБ (что заметно по присутствию пика Бхл *a* и плеча окенона) (рис. 4б). Оба водоема демонстрируют схожие доли квантов света, необходимых для окенона (520 нм) и фикоэритрина 545 (545 нм) относительно максимума спектра (табл. 3). Однако, в отличие от бухты Биофильтров, в оз. Кисло-Сладкое значительную долю составляет более

длинноволновый свет, доступный для Хл *c2*, который также входит в состав антенн криптофитовых. На свет, соответствующий поглощению Хл *a*, тоже усваиваемый *Rhodomonas*, приходится 15% светового потока против 4% в бухте Биофильтров. Возможно, этим можно объяснить высокую плотность популяции *Rhodomonas* при его цветении в ХК оз. Кисло-Сладкое. Таким образом, фототрофные организмы слабо изолированных водоемов, формирующие красную прослойку воды в ХК, усваивают наиболее доступный им свет в зеленой и желтой части спектра, в меньшей степени — в оранжевой, и крайне слабо — в красной.

Криптофитовые служат основным фототрофным компонентом ХК не только в беломорских отделяемых водоемах, но и в стратифицированных карстовых озерах Испании [77]. Однако там доминирует не *Rhodomonas* с коротковолновым фикоэритрином 545, а *Cryptomonas*, синтезирующий более длинноволновые фикобилины [78]. Помимо криптофитовых, там встречаются цианобактерии рода *Planktothrix*, также обладающие более длинноволновыми антеннами [77]. При этом свет, поступающий в зону ХК таких озер, имеет более широкий спектральный диапазон и по своей длинноволновой границе ближе к беломорским водоемам с пресным эпилимнионом, озерам Еловое и Трехцветное. Это согласуется с гипотезой цветовых ниш, задающих в качестве одного из определяющих селективных факторов спектральный состав света. К подобному выводу приходят и исследователи испанских озер, в которых, несмотря на географическую удаленность и иное происхождение водоемов, происходят схожие процессы в ХК [59].

Солоноватое оз. Б. Хрусломены по спектральным характеристикам проходящего света в зоне ХК занимает промежуточное положение между лагунами и водоемами с пресным эпилимнионом. Коротковолновая граница спектрального диапазона света, доходящего до ХК, совпадает с таковой в оз. Еловое. Однако правая граница полуширины находится посередине между значениями для оз. Кисло-Сладкое и оз. Еловое. Это позволяет ПСБ, обладающим океноном с максимумом поглощения около 521 нм, обитать в ХК оз. Б. Хрусломены.

Иная ситуация складывается в более изолированных водоемах — оз. Еловое и Трехцветное. Из-за высокого содержания гуминовых веществ свет в них проникает неглубоко, ХК расположен близко к поверхности воды, куда преимущественно доходят желтые, оранжевые и красные области спектра света. Если границы спектрального диапазона ХК этих озер относительно близки и различаются на 11–17 нм (с небольшим сдвигом в длинноволновую область для оз. Трехцветное), то

Таблица 2. Максимумы поглощения света *in vivo* пигментами фототрофных микроорганизмов, ожидаемых в беломорских прибрежных стратифицированных водоемах

Название пигмента	Максимумы поглощения <i>in vivo</i>	Организмы, для пигментов которых получены указанные максимумы	Ссылки
Хлорофилл <i>a</i>	406, 416, 434–440, 617–625, 671–677, 683	<i>Entomoneis paludosa</i> (Bacillariophyta), <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Chlorophyta), <i>Spirulina platensis</i> (Cyanophyta), <i>Porphyridium cruentum</i> (Rhodophyta), <i>Gymnodinium breve</i> (Dinophyceae), <i>Synechococcus</i> PCC7942 (Cyanobacteria), смесь морского фитопланктона	60, 61, 62, 63, 64
Хлорофилл <i>b</i>	470, 650–652, 660	<i>D. tertiolecta</i> (Chlorophyta), смесь морского фитопланктона	60, 62, 64
Хлорофилл <i>c</i> (<i>c1+c2+c3</i>)	453, 584–589, 638–639	Смесь морского фитопланктона, <i>G. breve</i> (Dinophyceae)	64, 63
Хлорофилл <i>d</i>	707–709, до 720	<i>Acaryochloris</i> MBIC11017, CCME5410 (Cyanobacteria)	61, 65
Бактериохлорофилл <i>a</i>	375, 590, 800–805, 830–911	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (пурпурные бактерии)	66, 67
Бактериохлорофилл <i>b</i>	400, 605, 835–850, 986–1035	Пурпурные бактерии	68
Бактериохлорофилл <i>d</i>	450, 718–730	<i>Ch. phaeovibrioides</i> , <i>Chlorobaculum limnaeum</i>	45, 69
Хлоробактин	≤450	<i>Ch. phaeovibrioides</i>	45
Бактериохлорофилл <i>e</i>	460–462, 520 (возможно, принадлежит изорениератину), 717–725	<i>Ch. phaeovibrioides</i> , <i>Ch. limnaeum</i>	45, 69, 68
Изорениератин	Около 505	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	70
Бактериохлорофилл <i>c</i>	460, 745–760	<i>Ch. phaeovibrioides</i> , <i>Ch. limnaeum</i>	45, 69
Фукоксантин	450 – 550	<i>E. paludosa</i> (Bacillariophyta), смесь морского фитопланктона	60, 62, 71
Фотосинтетические каротиноиды, PSC (PSC = α-каротин + 19'-гексаноилоксифукоксантин + 19'-бутаноилоксифукоксантин + фукоксантин + перидинин + прازیноксантин)	523	Смесь морского фитопланктона	64

Таблица 2. Окончание

Название пигмента	Максимумы поглощения <i>in vivo</i>	Организмы, для пигментов которых получены указанные максимумы	Ссылки
Миксоксантофилл	524	<i>S. platensis</i> (Cyanobacteria)	62
Диадиноксантин	438, 466, 495	<i>G. breve</i> (Dinophyceae)	63
Диатоксантин	496 (диадино- + + диатоксантин)	<i>E. paludosa</i> (Bacillariophyta)	62
Лютеин	500	<i>D. tertiolecta</i> (Chlorophyta)	62
Зеаксантин	489	<i>D. tertiolecta</i> (Chlorophyta), <i>S. platensis</i> (Cyanophyta), <i>P. cruentum</i> (Rhodophyta)	62
β -каротин	462–466, 499	<i>E. paludosa</i> (Bacillariophyta), <i>D. tertiolecta</i> (Chlorophyta), <i>S. platensis</i> (Cyanophyta), <i>P. cruentum</i> (Rhodophyta), смесь морского фитопланктона	60, 62
Фотопротекторные каротиноиды, РРС (РРС = β -каротин + + зеаксантин + диадино- ксантин + диатоксантин + + аллоксантин)	492	Смесь морского фитопланктона	64
Аллоксантин	505	<i>Rhodomonas salina</i>	72
Фикоэритробилин- содержащий фикоэритрин	547	Смесь морского фитопланктона	60
Фикоуробилин- содержащий фикоэритрин	492	Смесь морского фитопланктона	60
Окенон	521	<i>Thiocapsa marina</i> штамм 5811	73
Спириллоксантин	512	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	73

середины максимумов различаются существенно – на 48 нм. В оз. Еловое середина максимума проникающего в ХК света лежит в оранжевой, а в оз. Трехцветное – в красной области. Лучшее всего этот свет подходит для Хл *a*, *b* и *c*, и доли соответствующего света близки в этих двух озерах (табл. 3). Подходит этот свет и для антенн с фикоцианином [66] или аллофикоцианином [79]. В подтверждение этого в ХК оз. Еловое было отмечено цветение мелких жгутиконосцев зеленого цвета с флуоресценцией, похожей на флуоресценцию синих фикобилинов, и скопление *Eugle-*

na, а в оз. Трехцветное непосредственно над ХК – цветение криптофитовых водорослей зеленого цвета, вероятно, содержащих фикоцианин в сочетании с другими пигментами.

Отдельного внимания заслуживает совместное присутствие в ХК оз. Еловое и под ним двух штаммов ЗСБ *Ch. phaeovibrioides* – зелено- и коричнево-окрашенного – пигменты которых описаны в разделе «Результаты» выше. Антенны ЗСБ – хлоросомы, они покрыты липидным монослоем, состоят из упорядоченных в виде нанотрубок антенных Бхл *e* либо *d*, включают в себя

Таблица 3. Нормированные на максимум спектра относительные величины интенсивности света, проникающего в зону хемоклина, соответствующие максимумам поглощения *in vivo* ключевых антенных пигментов

Длина волны и соответствующие пигменты	Бухта Биофильтров	Озеро Кисло-Сладкое	Озеро Еловое	Озеро Трехцветное
505 нм (аллоксантин, изорениератин)	0.16	0.10	0.06	
520 нм (Бхл е, изорениератин, окенон)	0.28	0.25	0.16	0.04
545 нм (коротковолновый фикоэритрин <i>Rhodomonas</i>)	0.60	0.69	0.46	0.17
638 нм (Хл с)	0.21	0.44	0.96	0.97
660 нм (Хл b)	0.08	0.28	0.83	0.83
677 нм (Хл a)	0.04	0.15	0.70	0.70
717 нм (Бхл e, d)	–	0.03	0.09	0.29
730 нм (Бхл d)	–	–	–	0.06

Примечание. Прочерки означают положение данных длин волн за границами спектрального диапазона в хемоклине.

также каротиноиды и, в меньшем количестве, Бхл a [43]. Благодаря им ЗСБ способны фотосинтезировать при свете очень низкой интенсивности [76]. Максимумы поглощения *in vivo* Бхл d и e, соответствующие зелено- и коричнево-окрашенным бактериям, варьируют, согласно разным источникам (табл. 2), и существенно перекрываются. Свет, поглощаемый этими Бхл, составляет всего 9% от максимума спектра (при 717 нм), но в случае коричнево-окрашенных *Ch. phaeovibrioides* его недостаток компенсируется антенным изорениератином [70], свет для которого также доступен (табл. 3). Возможно, этим и объясняется присутствие коричнево-окрашенного штамма в ХК оз. Еловое [45, 21], и его отсутствие в оз. Трехцветное. В верхней части анаэробной зоны оз. Трехцветное существует высокоплотная популяция зелено-окрашенной формы *Ch. phaeovibrioides*, обладающей каротиноидом хлоробактином и антенным Бхл d [45]. Поскольку сведений о функционировании хлоробактина как антенного пигмента в литературе нет, можно предположить, что свет в указанном диапазоне усваивает Бхл d, способный улавливать свет с длинами волн 718–730 нм. Изорениератин, принадлежащий коричнево-окрашенной форме *Ch. phaeovibrioides*,

здесь, возможно, неэффективен: интенсивность сигнала в максимуме его поглощения составляет всего 4% от максимума спектра (табл. 3). Дискуссионным остается вопрос о том, почему в этих условиях у коричнево-окрашенной формы не может работать Бхл e в качестве главного антенного пигмента. Возможно, в условиях экстремально низкой освещенности для успешного поглощения света антенной необходим изорениератин, но для него здесь нет требуемых длин волн. Также в качестве одной из гипотез можно предположить, что причина – в разной ширине максимума поглощения Бхл d и e *in vivo*. Спектр поглощения света Бхл d шире, и подъем максимума начинается при длинах волн менее 700 нм [22, 26, 45, 80]. Таким образом, вероятно, что коричнево-окрашенная форма ЗСБ, которая формирует доминирующую бурую окраску ХК в оз. Еловое, при помощи изорениератина поглощает зеленый свет, а посредством Бхл e – еще и красный свет. Зелено-окрашенная форма в оз. Трехцветное, по-видимому, поглощает только красный свет и образует в ХК бактериальную пластину интенсивного зеленого цвета.

Аналогичная смена состава аноксигенных фототрофов, связанная со смещением спектров

пропускания света по мере увеличения концентрации РОВ, обнаружена в пресноводных стратифицированных озерах североамериканских штатов Мичиган и Висконсин [81]. В озерах с максимальной концентрацией гуминовых веществ в ХК доминировали зелено-окрашенные ЗСБ с Бхл *d*, тогда как в озерах с меньшим содержанием РОВ в бактериальном консорциуме присутствовали также ПСБ и коричневые формы ЗСБ. Связь цветовых вариаций бактерий из рода *Chlorobium* с глубиной расположения ХК и спектральным составом в этом горизонте была замечена также в меромиктических озерах Испании: зеленые *Ch. limicola* доминировали, если ХК находился на глубине 2–4 м, а коричневые *Ch. phaeobacteroides* – глубже 9 м [82].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экологические ниши морского и пресноводного фитопланктона обычно характеризуют при помощи таких общепринятых параметров, как соленость, температура, рН, содержание растворенного в воде кислорода, а также освещенность в тех или иных единицах интенсивности света, при этом оставляя за кадром спектральный состав света. Представления о проникновении в толщу воды в наибольшей степени синего света верны для открытых участков Мирового океана, но в прибрежных зонах требуют существенной корректировки. В нашей предыдущей работе [38] мы показали, как в водоемах береговой линии Белого моря в зависимости от степени изоляции и содержания РОВ формируются различные спектральные ниши. В настоящей работе мы исследовали связь между спектральным составом света в хемоклине и наличием антенных пигментов, способных улавливать этот свет, у фототрофов, обитающих в ХК. По спектральным условиям в ХК ковшовые губы и морские лагуны оказались очень близкими друг к другу, но, тем не менее, продемонстрировали закономерный сдвиг коротковолновой границы спектрального диапазона света в изоляционном ряду. На уровне таксономического и пигментного состава они обнаружили большое сходство: фототрофные организмы в ХК оказались адаптированы к усвоению света преимущественно в зеленой части спектра.

Более изолированные меромиктические озера с пресным миксолимнионом, Еловое и Трехцветное, также демонстрируют корреляцию между спектральным составом света и максимумами поглощения антенн характерных для них фототрофов. Смесь коричнево- и зелено-окрашенных ЗСБ в хемоклине Елового с преобладающим оранжево-красным светом сменяется доминирующим зелено-окрашенным штаммом ЗСБ в Трехцветном, где в хемоклин проникает преиму-

щественно красный свет. Криптофитовые водоросли *Rhodomonas* с коротковолновым фикоэритрином не встречаются в хемоклине этих водоемов. То, что причиной такой избирательности является состав света, а не другие абиотические факторы, такие как соленость, можно аргументировать, опираясь на описание ХК оз. Большие Хрусломены, переходного по своим спектральным характеристикам между морскими лагунами и озерами. Соленость в зоне ХК этого водоема ниже, чем в Еловом и Трехцветном [22], но, тем не менее, в нем регулярно возникает цветение *Rhodomonas*, характерного для морских водоемов. В отличие от цианобактерий, способных к фотоакклимации за счет изменений в фикобилисомах, *Rhodomonas* обладает меньшими возможностями в силу отсутствия фикобилисом и наличия только одного типа фикобилинов. Хотя для криптофитовых недавно была показана способность к фотоакклимации за счет модификаций хромофора, изменения спектра поглощения антенного пигмента не настолько существенны, чтобы дать им возможность освоить ниши оранжевого и красного света [83].

Перспективы данного исследования видятся в расширении круга исследуемых водоемов и пополнении точек в изоляционном ряду, анализе света и фототрофных сообществ в верхних слоях водоемов, оценке изменчивости спектрального состава света в разные времена года и, в конечном итоге, в определении роли спектрального состава света в сукцессии стратифицированных водоемов, отделяющихся от Белого моря.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят руководство Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова за возможность проведения исследований и использования оборудования на базе ББС МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00008).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van der Weij-De Wit C. D., Doust A. B., van Stokkum I. H. M., Dekker J. P., Wil K. E., Curmi P. M. G., Scholes G. D., and van Grondelle R. How Energy Funnel from the Phycoerythrin Antenna Complex to Photosystem I and Photosystem II in Cryptophyte *Rhodomonas* CS24 Cells. *J. Phys. Chem. B*, **110** (49), 25066 (2006). DOI: 10.1021/jp061546w
2. Lokstein H., Renger G., and Götze J. P. Photosynthetic Light-Harvesting (Antenna) Complexes-Structures and Functions. *Molecules*, **26** (11), 3378 (2021). DOI: 10.3390/molecules26113378
3. Arshad R., Saccon F., Bag P., Biswas A., Calvaruso C., Bhatti A. F., Grebe S., Mascoli V., Mahbub M., Muzzorappa F., Polyzois A., Schiphorst C., Sorrentino M., Streckaitė S., van Amerongen H., Aro E.-M., Bassi R., Boekema E. J., Croce R., Dekker J., van Grondelle R., Jansson S., Kirilovsky D., Kouřil R., Michel S., Mullineaux C. W., Panzarová K., Robert B., Ruban A. V., van Stokkum I., Wientjes E., and Büchel C. A kaleidoscope of photosynthetic antenna proteins and their emerging roles. *Plant Physiol.*, **189** (3), 1204–1219 (2022). DOI: 10.1093/plphys/kiac175
4. Stomp M., Huisman J., Stal L. J., and Matthijs H. C. P. Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *ISME J.*, **1** (4), 271–282 (2007).
5. Holtrop T., Huisman J., Stomp M., Biersteker L., Aerts J., Grébert T., Partensky F., Garczarek L., and Woerd H. J. V. D. Vibrational modes of water predict spectral niches for photosynthesis in lakes and oceans. *Nat. Ecol. Evol.*, **5** (1), 55–66 (2020). DOI: 10.1038/s41559-020-01330-x
6. Краснова Е. Д. Экология меромиктических озер России. I. Прибрежные морские водоемы. *Водные ресурсы*, **48** (3), 322 (2021).
7. Krasnova E., Voronov D., Frolova N., Pantyulin A., and Samsonov T. Salt Lakes Separated from the White Sea. *EARSeL eProceed.*, **14** (S1), 8–22 (2015). DOI: 10.12760/02-2015-1-02
8. Лосюк Г. Н., Кокрятская Н. М. и Краснова Е. Д. Сероводородное заражение прибрежных озер на разных стадиях изоляции от Белого моря. *Океанология*, **61** (3), 401–412 (2021).
9. Krasnova E. D., Kharcheva A. V., Milyutina I. A., Voronov D. A., and Patsaeva S. V. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods. *J. Mar. Biol. Ass.*, **95** (8), 1579–1590 (2015). DOI: 10.1017/S0025315415000582
10. Krasnova E. D., Matorin D. N., Belevich T. A., Efimova L. E., Kharcheva A. V., Kokryatskaya N. M., Losyuk G. N., Todorenko D. A., Voronov D. A., and Patsaeva S. V. The characteristic pattern of multiple colored layers in coastal stratified lakes in the process of separation from the White Sea. *J. Oceanol. Limnol.*, **36** (6), 1962–1977 (2018). DOI: 10.1007/s00343-018-7323-2
11. Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Пацаева С. В., Кокрятская Н. М., Жадан А. Э. и А. Б. Цетлин. Внезапный замор бентоса из-за появления сульфидной зоны в губе Лобаниха в августе 2020 г. (Белое море, Кандалакшский залив). В сб. *География: развитие науки и образования (Сб. статей по материалам международной науч.-практич. конф. «LXXIV Герценовские чтения»)* (Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, СПб, 2021), т. 1, сс. 313–317.
12. Логвиненко А. Д., Антоновская К. А., Гришина Д. Ю., Дадькин И. А., Киселев А. Д., Кроленко В. И., Лихачева Г. В., Уразаева А. О., Краснова Е. Д. и А. Б. Цетлин. Восстановление бентосного сообщества после кратковременной аноксии (замора) в арктической ковшовой губе (Белое море, Кандалакшский залив, о. Великий). В сб. *Труды X международной науч.-практич. конф. «Морские исследования и образование» (MARESE-DU-2021)* (Тверь: ООО ПолиПРЕСС, 2022), т. 2, сс. 115–118.
13. Краснова Е. Д. и Воронов Д. А. Подводное меромиктическое озеро в бухте Биофильтров (Белое море, Кандалакшский залив, окрестности Беломорской биостанции МГУ). В сб. *Геология морей и океанов (Материалы XXII Международной науч. конф. (Школы) по морской геологии)* (ИО РАН, М., 2019), т. 3, сс. 165–169.
14. Саввичев А. С., Кулакова А. А., Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Кадников В. В., Белецкий А. В., Козяев В. В., Русанов И. И., Летарова М. А., Веслополова Е. Ф., Беленкова В. В., Демиденко Н. А. и Горленко В. М. Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря. *Микробиология*, **91** (4), 492–506 (2022).
15. Krasnova E. D., Pantyulin A. N., Matorin D. N., Todorenko D. A., Belevich T. A., Milyutina I. A., and Voronov D. A. Cryptomonad alga *Rhodomonas* Sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) bloom in the redox zone of the basins separating from the White Sea. *Microbiology*, **83** (3), 270–277 (2014). DOI: 10.1134/S0026261714030102
16. Grouzdev D., Gaisin V., Lunina O., Krutkina M., Krasnova E., Voronov D., Baslerov R., Sigalevich P., Savvichev A., and Gorlenko V. Microbial communities of stratified aquatic ecosystems of kandalaksha bay (white sea) shed light on the evolutionary history of green and brown morphotypes of chlorobiota. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **98** (10), fiac103 (2022). DOI: 10.1093/femsec/fiac103
17. Sokolovskaya Y. G., Krasnova E. D., Voronov D. A., Matorin D. N., Zhiltsova A. A., and S. V. Patsaeva. Optical proxies of euxinia: spectroscopic studies of CDOM, chlorophyll, and bacteriochlorophylls in the lagoon on Zeleny cape (the White Sea). *Photonics*, **10** (6), 672 (2023). DOI: 10.3390/photonics10060672
18. Savvichev A. S., Lunina O. N., Rusanov I. I., Zakharova E. E., Veslopolova E. F., and Ivanov M. V. Microbi-

- ological and isotopic geochemical investigation of lake Kislo-Sladkoe, a meromictic water body at the Kandalaksha bay shore (White sea). *Microbiology*, **83** (1–2), 56–66 (2014).
19. Lunina O. N., Savvichev A. S., Krasnova E. D., Kokryatskaya N. M., Veslopolova E. F., Kuznetsov B. V., and Gorlenko V. M. Succession processes in the anoxygenic phototrophic bacterial community in lake Kislo-Sladkoe (Kandalaksha bay, White Sea). *Microbiology*, **85** (5), 531–544 (2016). DOI: 10.1134/S0026261716050118
20. Лосюк Г. Н., Краснова Е. Д., Кокрятская Н. М. и Воронов Д. А. Основные гидрологические параметры озера Большие Хрусломены (Кандалакшский залив Белого моря). *География: развитие науки и образования. Коллективная монография по материалам ежегодной Всероссийской с международным участием науч.-практич. конф. «LXXII Герценовские чтения»* (Астерион, СПб., 2019), т. 1, сс. 334–336 (2019).
21. Emeliantsev P. S., Zhiltsova A. A., Krasnova E. D., Voronov D. A., Rymar V. V., and Patsaeva S. V. Quantification of chlorosomal bacteriochlorophylls using absorption spectra of green sulfur bacteria in natural water. *Moscow Univ. Physics Bull.*, **75** (2), 137–142 (2020).
22. Lunina O. N., Grouzdev D. S., Patsaeva S. V., Zhil'tsova A. A., Suzina N. E., Krasnova E. D., Voronov D. A., Kokryatskaya N. M., Veslopolova E. F., and Savvichev A. S. Anoxygenic phototrophic bacteria of the meromictic lake Bol'shie Khruslomeny (Oleniy island, Kandalaksha gulf, Murmansk oblast, Russia). *Microbiology*, **92** (6), 792–806 (2023). DOI: 10.1134/S0026261723602051
23. Lisitzin A. P., Vasil'chuk Yu. K., Shevchenko V. P., Budantseva N. A., Krasnova E. D., Pantyulin A. N., Filipov A. S., and Chizhova Ju. N. Oxygen isotope composition of water and snow-ice cover of isolated lakes at various stages of separation from the White sea. *Dokl. Earth Sci.*, **449** (2), 406–412 (2013).
24. Vasil'chuk Yu. K., Frolova N. L., Krasnova E. D., Budantseva N. A., Vasil'chuk A. C., Dobrydneva L. V., Efimova L. E., Terskaya E. V., and Chizhova Ju. N. Water isotopic-geochemical composition in the Trekhtsvetnoe meromictic lake on the White sea coast. *Water Resources*, **43** (5), 828–838 (2016).
25. Savvichev A. S., Babenko V. V., Lunina O. N., Letarova M. A., Boldyreva D. I., Veslopolova E. F., Demidenko N. A., Kokryatskaya N. M., Krasnova E. D., Gaisin V. A., Kostryukova E. S., Gorlenko V. M., and Letarov A. V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake Trekhtzvetnoe. *Environ. Microbiol.*, **20** (10), 3784–3797 (2018).
26. Lunina O. N., Savvichev A. S., Babenko V. V., Boldyreva D. I., Kuznetsov B. B., Kolganova T. V., Krasnova E. D., Kokryatskaya N. M., Veslopolova E. F., Voronov D. A., Demidenko N. A., Letarova M. A., Letarov A. V., and Gorlenko V. M. Seasonal variations in the structure of an anoxygenic phototrophic bacterial community from the meromictic lake Trekhtsvetnoe (Kandalaksha bay, White sea). *Microbiology*, **88** (1), 100–114 (2019).
27. Леонтьев П. А., Субетто Д. А., Репкина Т. Ю., Лудикова А. В., Кузнецов Д. Д., Кублицкий Ю. А., Сапелко Т. В., Зарецкая Н. Е., Фирсенкова В. М., Потахин М. С., Сырых Л. С. и Толстобров Д. С. Реконструкция относительного перемещения уровня моря в голоцене на северо-западе Онежского полуострова (губа Конюхова, Белое море) на основе палеолимнологических исследований. *Изв. РАН. Сер. географическая*, **86** (6), 933–945 (2022).
28. Subetto D. A., Shevchenko V. P., Ludikova A. V., Kuznetsov D. D., Sapelko T. V., Lisitsyn A. P., Evzerov V. Ya., van Beek P., Souhaut M., and Subetto G. D. Chronology of isolation of the Solovetskii Archipelago lakes and current rates of lake sedimentation. *Dokl. Earth Sci.*, **446** (1), 1042–1048 (2012). DOI: 10.1134/S1028334X12090140
29. Колька В. В., Корсакова О. П., Шелехова Т. С. и Толстоброва А. Н. Восстановление относительного положения уровня Белого моря в позднеледниковье и голоцене по данным литологического, диатомового анализов и радиоуглеродного датирования донных отложений малых озер в районе пос. Чупа (северная Карелия). *Вестн. МГТУ* **2**, 255–268 (2015).
30. Колька В. В. и Корсакова О. П. Положение береговой линии Белого моря и неотектонические движения на северо-востоке Фенноскандии в позднеледниковье и голоцене. В сб. *Система Белого моря. Процессы осадконакопления, геология и история*. (М., Научный мир, 2017), т. 4, сс. 214–241.
31. Corner G. D., Yevzerov V. Y., Kolka V. V., and Möller J. J. Isolation basin stratigraphy and Holocene relative sea-level change at the Norwegian–Russian border north of Nikel, northwest Russia. *Boreas*, **28** (1), 146–166 (1999).
32. Kublitskiy Y., Repkina T., Leontiev P., Shilova O., Zaretskaya N., Gurinov A., Lugovoy N., Subetto D., Yakovleva A., Nam S. I., Kim J.-H., Son Y.-J., and Peretrakhina A. Reconstruction of relative sea-level changes based on a multiproxy study of isolated basins on the Onega Peninsula (the White Sea, northwestern Russia). *Quat. Int.*, **644–645**, 79–95 (2023). DOI: 10.1016/j.quaint.2022.04.016
33. Kirk J. T. O. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems* (Cambridge University Press, 1983).
34. Thoisen C., Hansen B. W., and Nielsen S. L. A simple and fast method for extraction and quantification of cryptophyte phycoerythrin. *MethodsX*, **4**, 209–213 (2017). DOI: 10.1016/j.mex.2017.06.002
35. Zhiltsova A. A., Krasnova E., Prosenkov A., Peláez Andrés A. I., Voronov D. A., and Patsaeva S. V. Depth distribution of optical characteristics, bacteriochlorophylls and metagenomic profiles of bacterial communities in meromictic lakes Trekhtzvetnoe and Elovoe in March 2021. In *XV Int. Conf. on Pulsed Lasers and Laser Applications*, Ed. by V. F. Tarasenko, A. V. Klimkin, and M. V. Trigub (Tomsk, 2021), pp. 54.

36. Zhiltsova A. A., Krasnova E. D., Voronov D. A., Losyuk G. N., Kokryatskaya N. M., and Patsaeva S. V. Simultaneous detection of chlorosomal bacteriochlorophylls from green sulfur bacteria and phycobilins from cyanobacteria using synchronous fluorescence scans. In *Optical Technologies for Biology and Medicine*. Ed. by E. A. Genina and V. V. Tuchin (Saratov, 2022), p. 24.
37. Pope R. M. and Fry E. S. Absorption spectrum (380–700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements. *Appl. Opt.*, **36**, 8710–8723 (1997).
38. Краснова Е. Д., Лобышев В. И., Лабунская Е. А., Воронов Д. А., Соколовская Ю. Г., Жильцова А. А. и Пацаева С. В. Спектральный состав света в хемоклине стратифицированных водоемов, находящихся на разных стадиях изоляции от Белого моря. *Оптика атмосферы и океана*, **37** (4), 307–315 (2024). DOI: 10.15372/AOO20240407
39. Gloe A., Pfennig N., Brockmann H. J., and Trowitzsch W. A new bacteriochlorophyll from brown-colored Chlorobiaceae. *Archive Microbiol.*, **102**, 103–109 (1975).
40. Borrego C. Arellano J., Abella C., Gillbro T., and Garcia-Gil J. The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll e and the pigment stoichiometry in Chlorobium Phaeobacteroides. *Photosynth. Res.*, **60**, 257 (1999). DOI: 10.1023/A:1006230820007
41. Haas S., De Beer D., Klatt J. M., Fink A., Rench R. M., Hamilton T. L., Meyer V., Kakuk B., and Macalady J. L. Low-light anoxygenic photosynthesis and Fe-S-biogeochemistry in a microbial mat. *Front. Microbiol.*, **9**, 858 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00858
42. *Carotenoids: Handbook*, Ed. by Britton G., Liaaen-Jensen S., and Pfander H. (Birkhäuser, Basel, 2004). DOI: 10.1007/978-3-0348-7836-4
43. Saer R. G. and Blankenship R. E. Light harvesting in phototrophic bacteria: structure and function. *Biochem. J.*, **474** (13), 2107–2131 (2017). DOI: 10.1042/BCJ20160753
44. Stadnichuk I. N., Novikova T. M., Miniuk G. S., Boichenko V. A., Bolychevtseva Y. V., Gusev E. S., and Lukashev E. P. Phycoerythrin association with photosystem II in the cryptophyte alga *Rhodomonas salina*. *Biochemistry (Moscow)*, **85** (6), 679–688 (2020). DOI: 10.1134/S000629792006005X
45. Kharcheva A. V., Zhiltsova A. A., Lunina O. N., Krasnova E. D., Voronov D. A., Savvichev A. S., and Patsaeva S. V. Bacteriochlorophyll fluorescence of green sulfur bacteria in the anaerobic zone of two natural water bodies. *Moscow Univ. Physics Bull.*, **73** (4), 377–381 (2018).
46. Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Жильцова А. А., Соколовская Ю. Г. и Пацаева С. В. Корреляция оптической плотности в ближнем УФ диапазоне и солености в поверхностных водах прибрежных стратифицированных водоемов на разных стадиях изоляции от Белого моря. В сб. *География: развитие науки и образования (Матер. международной науч.-практич. конф. «LXXVI Герценовские чтения»)* (Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена Санкт-Петербург, 2023), т. 1, сс. 250–254.
47. Bloor J. and Grubb P. Growth and mortality in high and low light: Trends among 15 shade-tolerant tropical rain forest tree species. *J. Ecol.* **91**, 77–85 (2003). DOI: 10.1046/j.1365-2745.2003.00743.x
48. Dale M. P. and Causton D. R. Use of the chlorophyll a/b ratio as a bioassay for the light environment of a plant. *Funct. Ecol.*, **6** (2), 190–196 (1992). DOI: 10.2307/2389754
49. Tanaka R. and Tanaka A. Chlorophyll b is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyryns*, **9**, 240–245 (2000)
50. Morales A. and Kaiser E. Photosynthetic acclimation to fluctuating irradiance in plants. *Front. Plant Sci.*, **24** (11), 268 (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00268
51. Kim J. Y., Lee J. H., and Park C. M. A multifaceted action of phytochrome B in plant environmental adaptation. *Front. Plant Sci.*, **22** (12), 659712 (2021). DOI: 10.3389/fpls.2021.659712
52. Brouwer B., Gardeström P., and Keech O. In response to partial plant shading, the lack of phytochrome A does not directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **65** (14), 4037 (2014).
53. Martinez-Garcia J. F. and Rodriguez-Concepcion M. Molecular mechanisms of shade tolerance in plants. *New Phytol.*, **239** (4), 1190 (2023).
54. Takahashi M. and Mikami K. Blue–red chromatic acclimation in the red alga *Pyropia yezoensis*. *Algal Res.*, **58**, 102428 (2021).
55. Stomp M., Huisman J., Vörös L., Pick F. R., Laamanen M., Haverkamp T., and Stal L. J. Colourful Coexistence of Red and Green Picocyanobacteria in Lakes and Seas. *Ecol. Lett.*, **10** (4), 290 (2007). DOI:10.1111/j.1461-0248.2007.01026.x
56. Stomp M., Huisman J., De Jongh F., Veraart A. J., Gerla D., Rijkeboer M., Ibelings B. W., Wollenzien U. I., and Stal L. J. Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, **432** (7013), 104 (2004). DOI:10.1038/nature03044
57. Маторин Д. Н., Годоренко Д. А., Воронов Д. А., Горячев С. Н., Братковская Л. Б. и Краснова Е. Д. Особенности распределения и состояния фитопланктона на разных глубинах в озере Кисло-Сладкое Белого моря. *Вестн. МГУ. Сер. 16: Биология*, **77** (3), 180–187 (2022).
58. Плотников А. О., Селиванова Е. А., Хлопко Ю. А., Воронов Д. А., Маторин Д. Н., Годоренко Д. А. и Краснова Е. Д. Структура и функционирование планктонных сообществ фототрофных и миксотрофных протистов в прибрежной лагуне «Озеро Кисло-Сладкое» (Белое море, Карельский берег). *Изв. РАН. Сер. географическая*, **86** (6), 985 (2022).
59. Camacho A. and E. Vicente. Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiol.*

- Ecol.*, **25** (1), 11–22 (1998). DOI: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00456.x
60. Bidigare R. R., Ondrusek M. E., Morrow J. H., and Kiefer D. A. In-vivo absorption properties of algal pigments. *Proc. SPIE 1302, Ocean Optics X*, Ed. by R. W. Spinrad (Orlando, FL, United States, 1990). DOI: 10.1117/12.21451
61. Duxbury Z., Schliep M., Ritchie R. J., Larkum A. W. D., and Chen M. Photoacclimation extends utilisable photosynthetically active radiation in the chlorophyll D-containing cyanobacterium, *Acaryochloris Marina Photosynth. Res.*, **101** (1), 69–75 (2009). DOI: 10.1007/s11120-009-9466-7
62. Méléder V., Laviale M., Jesus B., Mouget J.L., Lavaud J., Kazemipour F., Launeau P., and Barillé P. In vivo estimation of pigment composition and optical absorption cross-section by spectroradiometry in four aquatic photosynthetic micro-organisms. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **129**, 115 (2013). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.005
63. Millie D. F., Kirkpatrick G. J., and Vinyard B. T. Relating photosynthetic pigments and in vivo optical density spectra to irradiance for the Florida red-tide dinoflagellate *Gymnodinium breve*. *Marine Ecol. Progr. Series* **120**, 65 (1995). DOI: 10.3354/meps120065
64. Zhang Y., Wang G., Sathyendranath S., Xu. W., Xiao Y., and Jiang L. Retrieval of phytoplankton pigment composition from their *in vivo* absorption spectra. *Remote Sens.*, **13** (24), 5112 (2021). DOI: 10.3390/rs13245112
65. Taniguchi M. and Lindsey J. S. Absorption and fluorescence spectral database of chlorophylls and analogues. *Photochem. Photobiol.*, **97**, 136–165 (2021). DOI: 10.1111/php.13319
66. Croce R. and van Amerongen H. Natural strategies photosynthetic light harvesting. *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 492 (2014).
67. Kharcheva A. V., Krasnova E. D., Voronov D. A., and Patsaeva S. V. Spectroscopic study of the microbial community in chemocline zones of relic meromictic lakes separating from the White sea. *Proc. SPIE – The International Society for Optical Engineering*, Ed. by E. A. Genina, V. L. Derbov, K. V. Larin, D. E. Postnov, and V. V. Tuchin (Saratov, 2015), p. 944801.
68. Oren A. Characterization of pigments of prokaryotes and their use in taxonomy and classification. *Methods Microbiol.*, **38**, 261–282 (2011). DOI: 10.1016/B978-0-12-387730-7.00012-7
69. Harada J., Mizoguchi T., Tsukatani Y., Noguchi M., and Tamiaki H. A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna. *Sci. Rep.*, **2**, 671 (2012). DOI:10.1038/srep00671
70. Pšenčík J., Ma Y.-Z., Arellano J. B., Garcia-Gil J., and Gillbro T. Excitation energy transfer in chlorosomes of chlorobium phaeobacteroides strain CL1401: the role of carotenoids. *Photosynth. Res.*, **71** (1–2), 5–18 (2002). DOI: 10.1023/A:1014943312031
71. Premvardhan L., Sandberg D. J., Fey H., Birge R. R., Büchel C., and van Grondelle R. The charge-transfer properties of the S2 state of fucoxanthin in solution and in fucoxanthin chlorophyll-a/c2 protein (FCP) based on stark spectroscopy and molecular-orbital theory. *J. Phys. Chem. B*, **112** (37), 11838–11853 (2008). DOI: 10.1021/jp802689p
72. Šebelík V., West R., Trsková E. K., Kaňa R., and Polívka T. Energy transfer pathways in the CAC light-harvesting complex of *Rhodomonas salina*. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1861** (11), 148280 (2020). DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148280
73. Caumette P., Guyoneaud R., Imhoff J. F., Süling J., and Gorlenko V. *Thiocapsa Marina* Sp. Nov., a novel, okenone-containing, purple sulfur bacterium isolated from brackish coastal and marine environments. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **54** (4), 1031–1036. DOI: 10.1099/ijs.0.02964-0
74. Kereiče S., Kouril R., Oostergetel G. T., Fusetti F., Boekema E. J., Doust A. B., van der Weij-de Wit C. D., and Dekker J. P. Association of chlorophyll a/c(2) complexes to photosystem I and photosystem II in the cryptophyte *Rhodomonas CS24*. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1777** (9), 1122 (2008).
75. Polli D., Cerullo G., Lanzani G., De Silvestri S., Hashimoto H., and Cogdell R. J. Carotenoid-bacteriochlorophyll energy transfer in LH2 complexes studied with 10-fs time resolution. *Biophys. J.*, **90** (7), 2486 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.105.069286
76. Imhoff F. Biology of Green Sulfur Bacteria. In *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2014). DOI: 10.1002/9780470015902.a0000458.pub2
77. Camacho A. On the occurrence and ecological features of deep chlorophyll maxima (DCM) in spanish stratified lakes. *Limnetica*, **25** (1), 453–478 (2006). DOI: 10.23818/limn.25.32
78. Mercier L., Peltomaa E., and Ojala A. Comparative analysis of phycoerythrin production in cryptophytes. *J Appl. Phycol.*, **34**, 789–797 (2022). DOI: 10.1007/s10811-021-02657-z
79. Zilinskas B. A., Greenwald L. S., Bailey C. L., and Kahn P. C. Spectral analysis of allophycocyanin I, II, III and B from *Nostoc* sp. phycobilisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **592** (2), 267–276 (1980). DOI: 10.1016/0005-2728(80)90187-5
80. Zhiltsova A. A., Kharcheva A. V., Krasnova E. D., Lunina O. N., Voronov D. A., Savvichev A. S., Gorshkova O. M., and Patsaeva S. V. Spectroscopic study of green sulfur bacteria in stratified water bodies of the Kandalaksha gulf of the White sea. *Atmosphere. Ocean. Optics*, **31** (4), 390–396 (2018). DOI: 10.1134/S1024856018040188
81. Vila X., Cristina X. P., Abella C. A., and Hurley J. P. Effects of gilvin on the composition and dynamics of metalimnetic communities of phototrophic bacteria in freshwater North-American lakes. *J. Appl. Microbiol.*,

- 85 (S1), 138S–150S (1998). DOI: 10.1111/j.1365-2672.1998.tb05293.x
82. Montesinos E., Guerrero R., Abella C., and Esteve I. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1007–1016 (1983). DOI: 10.1128/aem.46.5.1007-1016.1983
83. Spangler L. C., Yu M., Jeffrey P. D., and Scholes G. D. Controllable phycobilin modification: an alternative photoacclimation response in cryptophyte algae. *ACS Cent. Sci.*, **8** (3), 340–350. DOI: 10.1021/acscentsci.1c01209

Underwater Measurements of Transmitted Light Spectra in Stratified Water Bodies on the White Sea Coast as a Key to the Understanding of Pigment Composition of Phototrophs in the Chemocline Zone

E.A. Labunskaya*, D.A. Voronov**, V.I. Lobyshev***, and E.D. Krasnova*

*Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**A.A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Bolshoy Karetny per. 19/1, Moscow, 127051 Russia

***Department of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119992 Russia

Measurements of the spectral composition of light at the boundary of the photic zone in seven coastal bodies of water, to varying degrees separated from the sea, exposed to the sea and freshwater lake showed that in marine and brackish water bodies green light is predominantly transmitted, and in lakes the top layer of which is freshwater, orange, red and far red light is absorbed. In meromictic reservoirs, the photic zone was limited by a colored layer of water with the massive development of phototrophic microorganisms. Their pigment composition and the spectral composition of transmitted light are well matched. The sea bays and lagoons were dominated by taxa with red pigments: phycoerythrin-545 from cryptophyte algae, or purple sulfur bacteria with the carotenoid okenone, or brown-colored green sulfur bacteria with isorenieratin and bacteriochlorophyll *e*. In the lakes the top layer of which is freshwater, unicellular algae or green sulfur bacteria with chlorobactene and bacteriochlorophyll *d* developed. The spectral range can serve as a selective factor that determines the composition of the community of phototrophs with structurally different antennas, but similar light absorption spectra.

Keywords: meromictic water bodies, light conditions, algal bloom, anoxygenic phototrophic bacteria, light absorbance spectra, deep chlorophyll maximum

УДК 535.37

КИНЕТИКА ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЭРИТРОЗИНА В ТКАНЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *in vitro*

© 2024 г. С.Н. Летуга*, А.Т. Ишемгулов*., М.А. Сеньчукова**

*Оренбургский государственный университет, просп. Победы, 13, Оренбург, 460018, Россия

**Оренбургский государственный медицинский университет, Советская ул., 6, Оренбург, 460000, Россия

E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 28.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

Исследована *in vitro* кинетика замедленной флуоресценции и фосфоресценции фотосенсибилизатора эритрозина во фрагментах нормальных тканей и злокачественных опухолей молочной железы пациенток онкологического диспансера. Показано, что кинетика замедленной флуоресценции красителя формируется как суперпозиция сигналов термоактивированной люминесценции и свечения, возникающего в результате синглет-триплетной аннигиляции молекул фотосенсибилизатора и синглетного кислорода. Обнаружено тушение аннигиляционной составляющей замедленной флуоресценции при возбуждении молекул серией из n импульсов с частотой 5–10 Гц. Форма кривой замедленной флуоресценции, интенсивность и длительность послесвечения молекул красителя определяются соотношением скоростей потребления/восстановления содержания кислорода в тканях. Установлена корреляция показателей замедленной флуоресценции с клинико-морфологическими характеристиками опухолей, обсуждается применение результатов в оптической экспресс-диагностике тканей.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы, импульсно-периодическое возбуждение, синглетный кислород, аннигиляция, замедленная флуоресценция, оптическая диагностика.

DOI: 10.31857/S0006302924030191, EDN: OECQUH

Оптические экспресс-методы исследования различных опухолей широко используются для ранней диагностики с целью повышения эффективности лечения онкологических заболеваний и поэтому востребованы в биологии и медицине. Перспективное направление развития оптической диагностики – использование длительной люминесценции (замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции) молекул-зондов. Длительная люминесценция возникает при излучательной релаксации долгоживущих метастабильных триплетных состояний молекул, которые за время жизни, как правило, успевают взаимодействовать с окружением, что повышает информативность метода и открывает дополнительные возможности для диагностики опухолей [1–10].

В настоящей работе представлены результаты исследования *in vitro* ЗФ и фосфоресценции ксантенового красителя эритрозина во фрагментах тканей молочной железы пациенток онкологического диспансера. Экспериментально регистри-

руемая ЗФ эритрозина в тканях представляет собой суперпозицию термоактивированного свечения типа E [12] и излучения, возникающего после синглет-триплетной аннигиляции триплет-возбужденной молекулы красителя и синглетного кислорода (механизм замедленной флуоресценции Каутского–Мюллера [11], или «singlet oxygen feedback delayed fluorescence» [13–17]). Далее аннигиляционную составляющую общего сигнала ЗФ будем обозначать как СТАЗФ.

В отличие от других разновидностей длительного послесвечения интенсивность СТАЗФ не монотонно зависит от концентрации кислорода в среде. В работах [18–20] показано, что при возбуждении эритрозина в нативных тканях лабораторных мышей в режиме флэш-фотолиза с частотой следования возбуждающих импульсов 5–10 Гц, в опухолях интенсивность СТАЗФ снижалась, а после окончания возбуждения в течение нескольких секунд обратимо восстанавливалась до первоначального уровня. Авторы связали это явление с образованием синглетного кислорода и его более активным расходом в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Цель насто-

Сокращения: ЗФ – замедленная флуоресценция, СТАЗФ – аннигиляционная составляющая общего сигнала ЗФ.

Таблица 1. Распределение полученных образцов по гистологической картине

Гистологическая картина	Количество образцов	Наличие злокачественности
Протоковый рак молочной железы	53	Да
Другие формы рака молочной железы (листовидная, папиллярная, муцинозная формы)	9	Да
Доброкачественная опухоль (фиброаденома или мастит)	14	Нет
Лимфоузел без метастазов	89	Нет
Лимфоузел с метастазом	3	Да
Лимфоузел (реактивные изменения)	12	Нет
Всего образцов	180	

ящей работы состоит в распространении методики, апробированной в работах [18–20] на животных, на исследования тканей человека, что приближает разработку к практическому внедрению. Обнаруженные особенности послесвечения молекул могут быть использованы для диагностики патологий и оценки краев резекции при хирургическом удалении опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы ткани молочной железы, полученные хирургическим путем от 81 пациентки. Средний возраст пациенток – 57,9 лет.

Производился хирургический забор опухолевой ткани и лимфоузлов, фрагменты макропрепаратов направлялись на гистологию и одновременно на исследования кинетики затухания длительной люминесценции молекул-зондов. Гистологическое исследование проводилось в ГАУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер» (Оренбург, Россия). Гистологические и флуоресцентные исследования проводились параллельно и независимо (двойное слепое исследование). Распределение образцов по результатам гистологии показано в табл. 1.

После удаления операционного препарата исследуемые макропрепараты рассекались на 2 равные части. Выполнялись срезы с поверхности рассеченного лимфоузла и краев резекции толщиной 1 мм. Образцы помещали в среду 199 с солями Хэнкса для транспортирования из операционной в лабораторию. Время от забора образца до измерения люминесценции составляло в среднем 1 ч.

Окрашивание проводили путем погружения в физиологический раствор с эритрозинном (концентрация красителя 10^{-3} моль/л) на 1 мин, затем образцы промывали в чистом физиологическом

растворе, чтобы удалить невпитавшийся краситель. Подготовленные фрагменты тканей размещали в герметичной термостатируемой камере. Одновременно в камере можно разместить до шести фрагментов, этим обеспечивались одинаковые условия эксперимента для всех образцов. Каждый фрагмент накрывали тонкой металлической пластиной с круглым отверстием диаметром 5 мм. К камере при необходимости подключали баллон со сжатым азотом для снижения концентрации кислорода в атмосфере над образцами. Эксперимент проводили при комнатной температуре (20–25°C).

Кинетика затухания длительной люминесценции исследовалась методом флэш-фотолиза на автоматизированной установке динамической спектрофлуориметрии. Для возбуждения длительной люминесценции эритрозина использовали излучение второй гармоники (532 нм) импульсно-периодического твердотельного лазера на YAG:Nd³⁺ (лазер LQ-214, Solar, Беларусь). Энергия возбуждающего импульса варьировалась в диапазоне 0,2–30 мДж при длительности 10 нс. Возбуждение производилось не одним импульсом, а серией из 7–10 импульсов с частотой 5–10 Гц. Свечение регистрировалось через монохроматор МДР-41 с помощью фотоумножителя ФЭУ-84-3, имеющего специальный электрод для управления чувствительностью. Для аппроксимации кривых использовалась программа Wolfram Mathematica.

Эритрозин (Acros Organics, Индия) – синтетический краситель, широко использующийся в качестве фотосенсибилизатора в фотодинамической терапии и флуоресцентном анализе [21–23]. Благодаря наличию в своей структуре тяжелых атомов йода эритрозин обладает высоким квантовым выходом Φ_T в триплетное состояние (в физиологическом растворе $\Phi_T \approx 0,98$), что позволяет

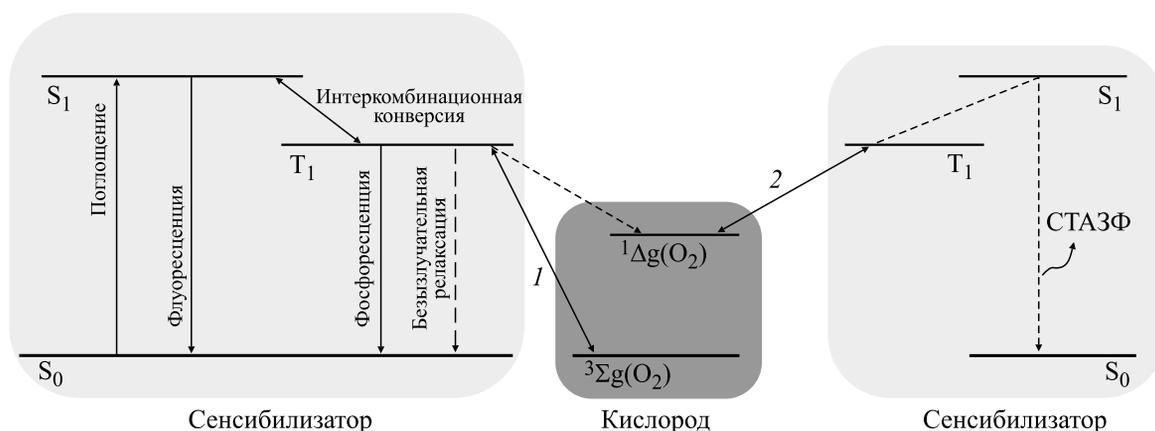


Рис. 1. Схема возникновения замедленной флуоресценции после синглет-триплетной аннигиляции.

использовать его одновременно и в качестве сенсibilизатора синглетного кислорода, и в качестве реагента в реакции кросс-аннигиляции, сопровождающейся СТАЗФ. Эритрозин имеет относительно большой коэффициент экстинкции на длине волны 532 нм (сечение поглощения в физиологическом растворе $\sigma \approx 2.8 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$) и яркую флуоресценцию, что облегчает визуализацию свечения при диагностике. Эритрозин фотостабилен, растворим в воде и хорошо проникает в ткани. Вместе с тем длины волн возбуждения и излучения эритрозина (500–540 нм и 550–700 нм соответственно) находятся на краю «терапевтического окна», что ограничивает глубину проникновения света в ткани и его применение при обнаружении и терапии глубоко расположенных опухолей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Двухстадийную реакцию возникновения СТАЗФ можно описать следующим образом (рис. 1): при взаимодействии T_1 -состояния люминофора с молекулярным кислородом 3O_2 происходит передача энергии $T_1 \rightarrow ^3O_2$, при этом образуется синглетный кислород 1O_2 : $T_1 + ^3O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$ (обозначено цифрой 1 на рис. 1). Эффективность этого процесса пропорциональна концентрации молекул в T_1 -состояниях и содержанию свободного кислорода в ткани. На втором этапе происходит синглет-триплетная аннигиляция $T_1 + ^1O_2$ и образуются флуоресцентные S_1 -состояния: $T_1 + ^1O_2 \rightarrow S_1 + ^3O_2$ (обозначено цифрой 2 на рис. 1). Количество образуемого синглетного кислорода в ткани непосредственно влияет на интенсивность СТАЗФ.

Полагая, что в тканях связанные молекулы красителя имеют ограниченную подвижность,

при описании кинетики ЗФ можно не учитывать вклад свечения, возникающего после аннигиляции $T_1 + T_1$ двух триплет-возбужденных молекул эритрозина (ЗФ Р-типа [12]). Если воспользоваться формально-кинетическим описанием кинетики ЗФ, то интенсивность свечения определяется выражением [18]

$$I_{3\Phi}(t) = \phi_{\text{фл}} k_{o_2} p_S n_T(t) n_{o_2}(t) + \phi_{\text{фл}} k_{T,S_1} n_T(t), \quad (1)$$

где $\phi_{\text{фл}}$ – квантовый выход флуоресценции, p_S – вероятность генерации S_1 -состояний молекул в реакции синглет-триплетной аннигиляции ($T_1 + ^1O_2$), k_{o_2} – скорость синглет-триплетной аннигиляции, k_{T,S_1} – скорость перехода из нижнего триплетного (T_1) в синглетное (S_1) состояние, $n_T(t)$ – концентрация молекул в триплетном состоянии, $n_{o_2}(t)$ – концентрация синглетного кислорода. Первое слагаемое в выражении (1) определяет СТАЗФ, а второе – термоактивированную ЗФ типа Е [12].

Экспериментальная зависимость $I_{3\Phi}(t)$ представлена на рис. 2. При нормальных условиях на коротких временах вклад второго слагаемого в выражение (1) невелик. В диапазоне времени 1–10 мкс основной вклад в ЗФ дает свечение, обусловленное СТАЗФ. Длительность этого свечения лимитируется временем жизни синглетного кислорода в среде. На больших временах наблюдается только термоактивированная ЗФ, интенсивность которой много меньше СТАЗФ.

При импульсно-периодическом возбуждении с частотой 5–10 Гц в некоторых тканях имеет место обратимое снижение интенсивности СТАЗФ (обратимое тушение ЗФ), в большей степени характерное для злокачественных опухолей (рис. 2а). В зависимости от типа патологии в тканях тушение интенсивности ЗФ сразу после окончания серии возбуждающих импульсов со-

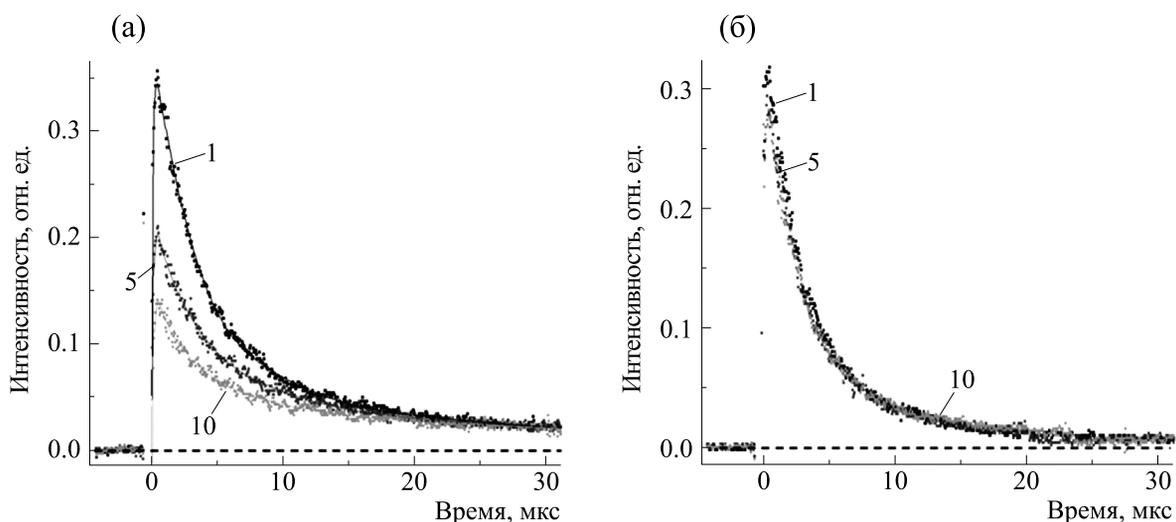


Рис. 2. Кинетика затухания замедленной флуоресценции эритрозина: (а) — в тканях злокачественной опухоли молочной железы (патология подтверждена гистологическими исследованиями) и (б) — в прилегающем лимфоузле (без патологии) после первого, пятого и десятого возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

ставляло от нескольких процентов до свыше 60%. Кинетика обратимого восстановления интенсивности и формы кривой ЗФ эритрозина исследованы по методике, описанной в работе [19]. Время полного восстановления кривой составляло 5–7 с (рис. 3).

Тушение СТАЗФ зависит от частоты возбуждения: эффективность тушения повышается с увеличением частоты (рис. 3а). Из выражения (1) следует, что при неизменной интенсивности возбуждения (начальная концентрация n_T молекул в триплетном состоянии одинаковая после каждого возбуждающего импульса) яркость СТАЗФ снижается в том случае, если уменьшается множитель $n_{O_2}(t)$, т.е. если уменьшается содержание кислорода в ткани. После окончания первого воз-

буждающего импульса в ткани образуется синглетный кислород, активно вступающий в химические реакции с окружением, и в целом концентрация кислорода в ткани уменьшается. Одновременно кислород поступает в ткань из атмосферы. Если скорость потребления кислорода превышает скорость его восстановления в ткани, то множитель $n_{O_2}(t)$ будет уменьшаться и произойдет тушение СТАЗФ. С увеличением частоты следования возбуждающих импульсов сокращается время на восстановление концентрации кислорода в ткани, поэтому эффективность тушения свечения будет возрастать.

Поскольку по мере импульсно-периодического облучения окрашенной ткани в ней снижается концентрация кислорода, то следует ожидать по-

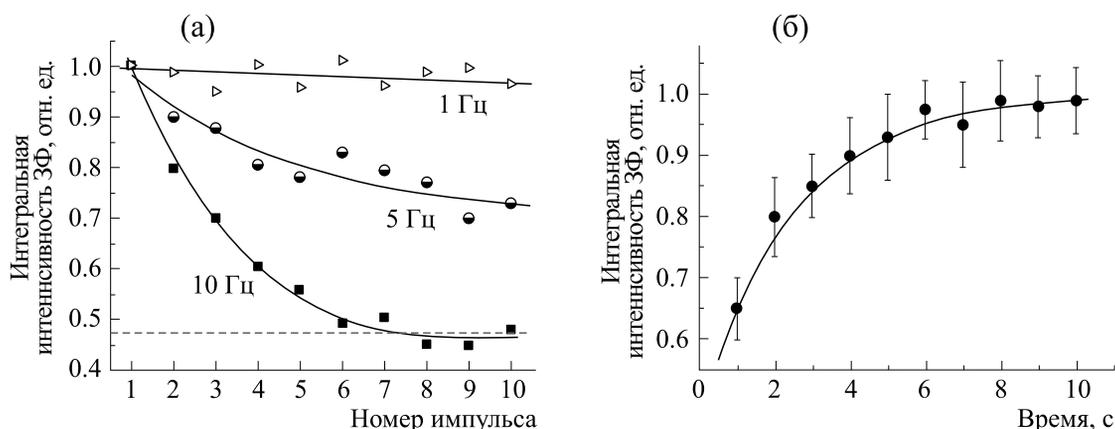


Рис. 3. Интегральная интенсивность замедленной флуоресценции (площадь под кинетической кривой на участке 1–10 мкс) эритрозина в опухоли молочной железы: (а) — в ходе импульсно-периодического возбуждения с разной частотой; (б) — спустя указанное время после 10-импульсного возбуждения с частотой 10 Гц.

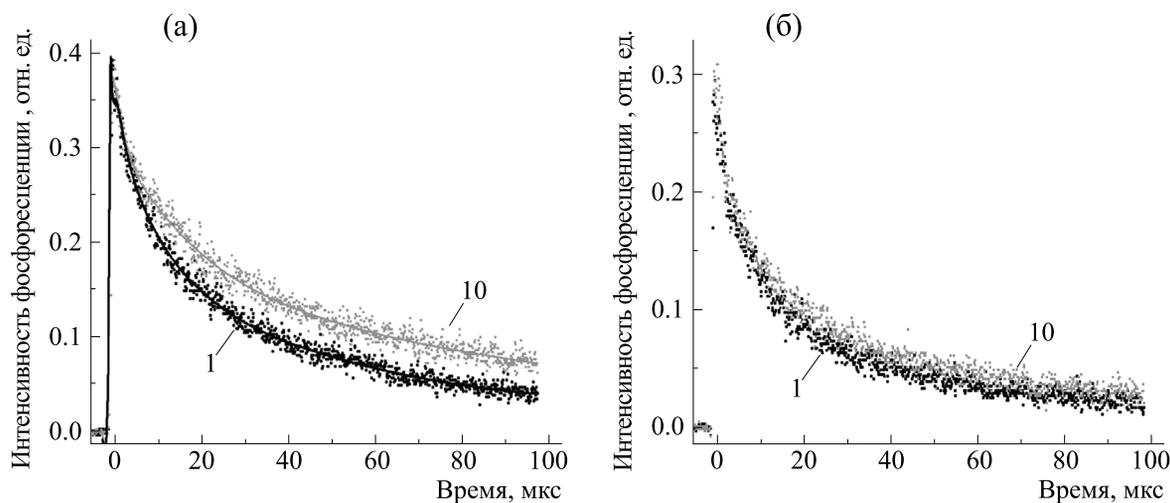


Рис. 4. Кинетика затухания фосфоресценции эритрозина в тканях злокачественной опухоли молочной железы (а) и в прилегающем лимфоузле (б) после первого и десятого возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

вышения интенсивности и увеличения продолжительности свечения фосфоресценции и термоактивированной ЗФ. На рис. 4 приведены кинетические кривые затухания фосфоресценции эритрозина в тех же образцах и при тех же условиях, что представлены на рис. 1. Хорошо видно, что интегральная интенсивность фосфоресценции после 10-го импульса выросла на 20% (отношение площадей под кинетическими кривыми), а длительность свечения увеличилась от 40 до 80 мкс. При этом начальная интенсивность фосфоресценции остается неизменной.

Интенсивность термоактивированной ЗФ также увеличивается. На рис. 5 представлены кинетические кривые ЗФ эритрозина в диапазоне вре-

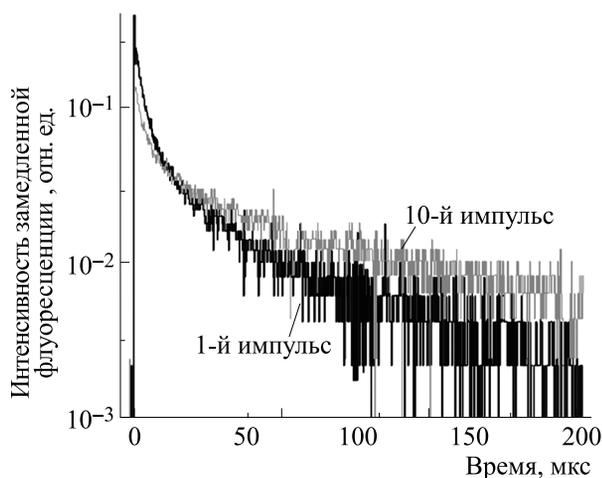


Рис. 5. Кинетика затухания ЗФ эритрозина (в полугарифмических координатах) в опухоли молочной железы после первого (черная кривая) и десятого (серая кривая) возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

мени 0–200 мкс. Начиная примерно с 30–50 мкс после возбуждения характер затухания кинетической кривой становится практически экспоненциальным, что указывает на мономолекулярный характер релаксации триплетных T_1 -состояний эритрозина. Из рис. 5 видно, что после 10-го импульса возбуждения с частотой 10 Гц интенсивность СТАЗФ уменьшается, а интенсивность и длительность термоактивированной ЗФ, наоборот, закономерно увеличиваются.

В пользу предложенной «кислородной» модели тушения СТАЗФ свидетельствуют следующие экспериментальные факты. Параметры кинетических кривых ЗФ не меняются при частотах строб-возбуждения меньше 1 Гц (рис. 3а). При другом механизме тушения, например, фотообесцвечивании красителя, эффект регистрировался бы при любой частоте. В окрашенных тканях в диапазоне длин волн 300–800 нм не обнаружены новые полосы в спектрах возбуждения флуоресценции эритрозина или новые линии свечения возможных короткоживущих продуктов фотореакций. Начальная интенсивность фосфоресценции после каждого возбуждающего импульса не изменяется (рис. 4б), что однозначно указывает на постоянство концентрации красителя в ткани. На основании этих экспериментальных данных можно утверждать, что причина обратимого тушения СТАЗФ заключается именно в кратковременном снижении уровня кислорода в облучаемых биотканях.

Изменение кинетики длительной люминесценции эритрозина в зависимости от содержания кислорода в тканях проиллюстрировано экспериментально при продувке камеры с образцами газообразным азотом. Удаление кислорода из тканей и его восстановление после обратной закачки

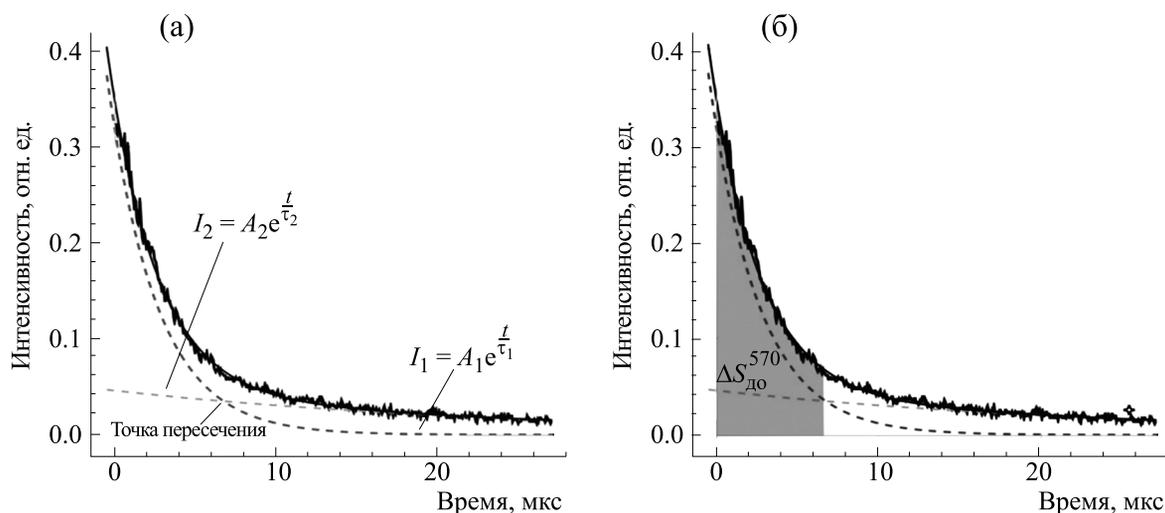


Рис. 6. Иллюстрация математической обработки кинетической кривой: (а) – аппроксимация кинетической кривой затухания замедленной флуоресценции двумя экспонентами, нахождение точки пересечения; (б) – определение величины $\Delta S_{\text{до}}^{570}$.

воздуха в камеру сопровождаются обратимыми изменениями интенсивности и формы ЗФ и фосфоресценции, аналогичными представленным на рис. 2 и 4.

Тушение СТАЗФ с одновременным увеличением интенсивности термоактивированной ЗФ и фосфоресценции молекул-зондов в тканях при импульсно-периодическом возбуждении преимущественно имеет место в злокачественных опухолях и может служить признаком, указывающим на развитие патологии. Для сравнения люминесцентных характеристик (интенсивность и длительность свечения) в выборке «есть опухоль» и в выборке «нет опухоли», применен t -критерий Стьюдента [24], широко использующийся в биомедицинских приложениях. Уровень значимости критерия выбран $\alpha = 0.01$, критическое значение для выборки 2.609.

Все образцы отбирали, окрашивали и облучали при одних и тех же условиях. Регистрацию свечения молекул проводили путем записи серий из 10 кинетических кривых затухания ЗФ (570 нм) и фосфоресценции (680 нм) эритрозина при импульсном возбуждении с частотой 10 Гц. Математическую обработку полученной серии кинетических кривых проводили следующим образом (см. также рис. 6):

– каждую кинетическую кривую в серии аппроксимировали двумя экспонентами (см. также рис. 5):

$$I(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}; \quad (2)$$

– автоматически определялась точка пересечения двух экспонент на временной оси;

– площадь под кинетической кривой до точки пересечения определяли как $S_{\text{до}}(i)$, где $i = 1, 2, 3, \dots, 10$ – порядковый номер возбуждающего импульса;

– площадь под кинетической кривой после точки пересечения определяли как $S_{\text{после}}(i)$;

– для каждой серии кинетических кривых составляли 4 таблицы следующих величин: $S_{\text{до}}(i)/S_{\text{до}}(1)$; $S_{\text{после}}(i)/S_{\text{после}}(1)$; $\tau_1(i)/\tau_1(1)$; $\tau_2(i)/\tau_2(1)$; т.е. все полученные значения нормировали на аналогичную величину после первого импульса.

Для построения кривых на рис. 3а использованы значения $S_{\text{до}}(i)/S_{\text{до}}(1)$ ЗФ эритрозина. Видно, что при частоте возбуждения 10 Гц уже примерно после пятого импульса тушение СТАЗФ закономерно выходит на насыщение. Для оценки изменения $S_{\text{до}}$ за 10 импульсов использовали следующее отношение:

$$\Delta S_{\text{до}} = \frac{\frac{S_{\text{до}}(6)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(7)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(8)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(9)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(10)}{S_{\text{до}}(1)}}{5}. \quad (3)$$

На рис. 3а значение этой величины при частоте возбуждения 10 Гц показано пунктиром. Очевидно, если $\Delta S_{\text{до}}$ мало отличается от единицы, то можно считать, что данный параметр не изменяется в ходе многоимпульсного возбуждения.

В ходе анализа выявлены четыре величины, по изменению которых могут различаться злокачественные опухоли и нормальные ткани:

– изменение интегральной интенсивности ЗФ на отрезке времени до точки пересечения двух ап-

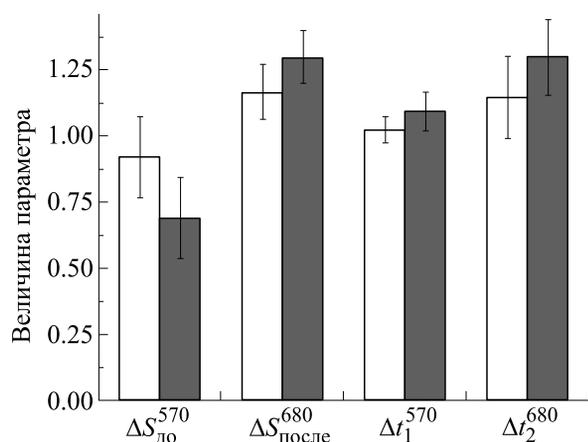


Рис. 7. Изменение параметров длительной люминесценции эритрозина в тканях без злокачественной опухоли (белые столбики) и в злокачественных опухолях (серые столбики).

проксимирующих экспонент $\Delta S_{до}^{570}$ — соответствует тушению СТАЗФ;

— изменение интегральной интенсивности фосфоресценции на участке после точки пересечения двух аппроксимирующих экспонент $\Delta S_{после}^{680}$ — соответствует увеличению интенсивности фосфоресценции;

— изменение показателя первой аппроксимирующей экспоненты для кривой затухания ЗФ Δt_1^{570} — показывает изменение длительности свечения короткоживущей компоненты ЗФ (СТАЗФ);

— изменение показателя второй аппроксимирующей экспоненты для кривой затухания фосфоресценции Δt_2^{680} — показывает изменение времени жизни долгоживущей компоненты фосфоресценции.

Результаты исследования 180 образцов тканей разделены на две выборки: «нет злокачественной опухоли» и «есть злокачественная опухоль». При этом в выборку «нет злокачественной опухоли» включены доброкачественные новообразования и ткани с реактивными изменениями. Каждая из этих выборок удовлетворяла критерию нормальности. Для выбранных величин t -критерий оказался больше критического: для $\Delta S_{до}^{570}$ — 9.405, для $\Delta S_{после}^{680}$ — 8.173, для Δt_1^{570} — 6.973, для Δt_2^{680} — 6.438. На рис. 7 результаты представлены в виде гистограмм.

Полученные результаты дают основание утверждать, что в злокачественных опухолях вероятность обнаружить изменение параметров длительной люминесценции фотосенсибилизатора

выше по сравнению с нормальными тканями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено изменение интенсивности и формы кинетических кривых затухания длительной люминесценции эритрозина в тканях молочной железы при периодическом возбуждении лазерными импульсами длительностью 10 нс, следующих с частотой 10 Гц. Наибольшие изменения отмечены для:

— участка кинетической кривой затухания ЗФ (диапазон 1–10 мкс) — интенсивность свечения уменьшается, продолжительность свечения увеличивается;

— кинетической кривой затухания фосфоресценции (диапазон от 20 до 600 мкс) — интенсивность и продолжительность свечения увеличиваются.

Обнаружено статистически значимое различие интенсивности и длительности свечения молекул-зондов в злокачественных опухолях (32 образца) и нормальных (59 образцов) тканях с помощью t -критерия Стьюдента с уровнем значимости 0.01:

— изменение интенсивности (площади под кинетической кривой) ЗФ в диапазоне 1–10 мкс;

— изменение длительности затухания ЗФ в диапазоне 1–10 мкс;

— изменение длительности затухания фосфоресценции (от 20 до 600 мкс).

Полученные результаты могут найти применение в биомедицинской диагностике онкологических заболеваний, в том числе для экспресс-диагностики краев резекции тканей в ходе операции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность и признательность коллективу ГАУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер» и всем пациентам, принявшим участие в исследовании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № FSGU-2023-0003) и Российского научного фонда (грант № 23-25-00183).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и международно-признанными рекомендациями после одобрения исследований Комитетом по этике Оренбургского государственного медицинского университета (протокол № 311 от 13 января 2023 г.). Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tuchin V. V. *Tissue optics, light scattering methods and instruments for medical diagnostics* (SPIE Press Book, 2015).
- Demchenko A. P. *Introduction to fluorescence sensing* (Wiesbaden, Springer Science & Business Media, 2010).
- Berezin M. Y. and Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.*, **110**, 2641–2684 (2010). DOI: 10.1021/cr900343z
- Mieog J. S. D., Achterberg F. B., Zlitni A., Hutteman M., Burggraaf J., Swijnenburg R.-J., Gioux S., and Vahrmeijer A. L. Fundamentals and developments in fluorescence-guided cancer surgery. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19** (1), 9–22 (2022). DOI: 10.1038/s41571-021-00548-3
- Ito R., Kamiya M., and Urano Y. Molecular probes for fluorescence image-guided cancer surgery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **67**, 102112 (2022). DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.102112
- Lan M., Zhao Sh., Liu W., Lee Ch.-S., Zhang W., and Wang P. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Healthcare Mater.*, **8** (13), E1900132 (2019). DOI: 10.1002/adhm.201900132
- Janotka M. and Ostadal P. Biochemical markers for clinical monitoring of tissue perfusion. *Mol. Cell Biochem.*, **473** (3), 1313–1326 (2021). DOI: 10.1007/s11010-020-04019-8
- Murphy M. P., Bayir H., Belousov V., Chang Ch. J., Davies K. J. A., Davies M. J., Dick T. P., Finkel T., Forman H. J., Janssen-Heininger Y., Gems D., Kagan V. E., Kalyanaraman B., Larsson N.-G., Milne G. L., Nyström Th., Poulsen H. E., Radi R., Van Remmen H., Schumacker P. T., Thornalley P. J., Toyokuni Sh., Winterbourn Ch. C., Yin H., and Halliwell B. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat. Metab.*, **4** (6), 651–662 (2022). DOI: 10.1038/s42255-022-00591-z
- Rey-Barroso L. Optical Technologies for the Improvement of Skin Cancer Diagnosis: A Review. *Sensors (Basel)*, **21** (1), 252 (2021). DOI: 10.3390/s21010252
- Grosenick D., Rinneberg H., Cubeddu R., and Taroni P. Review of optical breast imaging and spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, **21** (9), 091311 (2016). DOI: 10.1117/1.JBO.21.9.091311
- Kautsky H. and Müller G. Luminescenzumwandlung durch Sauerstoff. Nachweis geringster Sauerstoffmengen. *Z. Naturforsch. A*, **2**, 167–172 (1947). DOI: 10.1515/zna-1947-0308
- Parker C. A. and Hatchard C. G. Triplet-singlet emission in fluid solutions. *Trans. Faraday Soc.*, **57**, 1894–1904 (1961). DOI: 10.1039/TF9615701894
- Kenner R. D. and Khan A. U. Molecular oxygen enhanced fluorescence of organic molecules in polymer matrices: a singlet oxygen feedback mechanism. *J. Chem. Phys.*, **64** (5), 1877–1882 (1976). DOI: 10.1063/1.432471
- Croizat G., Gregor A., Gerelli E., Joniova J., Scholz M., and Wagnières G. A general framework for non-exponential delayed fluorescence and phosphorescence decay analysis, illustrated on protoporphyrin IX. *J. Photochem. Photobiol. B*, **209**, 111887 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111887
- van Dijk L. J. D., Ubbink R., Terlouw L. G., van Noord D., Mik E. G., Bruno M. J. Oxygen-dependent delayed fluorescence of protoporphyrin IX measured in the stomach and duodenum during upper gastrointestinal endoscopy. *J. Biophotonics*, **12**, e201900025 (2019). DOI: 10.1002/jbio.201900025
- Mosinger J, Lang K., Hostomský J., Franc J., Sýkora J., Hof M., and Kubát P. Singlet oxygen imaging in polymeric nanofibers by delayed fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, **114** (48), 15773–15779 (2010). DOI: 10.1021/jp105789p
- Scholz M., Gunn J. R., Luke G. P., and Pogue B. W. Imaging of singlet oxygen feedback delayed fluorescence and lysosome permeabilization in tumor *in vivo* during photodynamic therapy with aluminum phthalocyanine. *J. Biomed. Opt.*, **25** (6), 063806 (2020). DOI: 10.1117/1.JBO.25.6.063806
- Letuta S. N., Pashkevich S. N., Ishemgulov A. T., Lantukh Y. D., Alidzhanov E. K., Sokabaeva S. S., and Bryukhanov V. V. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry. *J. Photochem. Photobiol. B*, **163**, 231–236 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036
- Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Letuta U. G., and Pashkevich S. N. Continuous *in vivo* monitoring of the oxygen concentration in tissues. *Biophysics*, **63** (5), 798–804 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918050160
- Letuta S. N. Monitoring of Changes in Oxygen Concentration in Tissues by the Kinetics of Delayed Fluorescence of Exogenous Dyes. *Opt. Spectr.*, **127**, 1169–1176 (2019). DOI: 10.1134/S0030400X19120129
- Ke E. Sh., Nazzal S., Tseng Y.-H., Chen Ch.-P., and Tsai Ts.-M. Erythrosine-mediated photodynamic inactivation of bacteria and yeast using green light-emitting diode light. *J. Food Drug Anal.*, **20** (4), 951–956 (2012). DOI: 10.6227/jfda.2012200426
- Garg A. D., Bose Muthiah, Ahmed M. I., Bonass W. A., and Wood S. R. *In Vitro* Studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. *PLoS One*, **7** (4), e34475 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0034475

23. Yesilgul N. Singlet Oxygen Generation with Chemical Excitation of an Erythrosine–Luminol Conjugate. *ACS Omega*, **2** (4), 1367–1371 (2017). DOI: 10.1021/acsomega.7b00228
24. Mishra P., Singh U., Pandey Ch. M., Mishra P., and Pandey G. Application of Student's *t*-test, analysis of variance, and covariance. *Ann. Card. Anaesth.*, **22** (4), 407–411 (2019). DOI: 10.4103/aca.ACA_94_19

Long-Term Luminescence Kinetics of Erythrosine in Breast Tissue *in vitro*

S.N. Letuta*, A.T. Ishemgulov*, and M.A. Senchukova**

*Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

**Orenburg State Medical University, Sovetskaya ul. 6, Orenburg, 460000 Russia

The kinetics of delayed fluorescence and phosphorescence of the photosensitizer erythrosine in fragments of normal tissues and malignant breast tumors of patients at an oncology clinic was studied *in vitro*. It has been shown that the kinetics of delayed fluorescence of the dye is formed as a superposition of signals of thermally activated luminescence and luminescence resulting from singlet-triplet annihilation of photosensitizer molecules and singlet oxygen. The quenching of the annihilation component of delayed fluorescence was discovered when molecules were excited by a series of *n* pulses with a frequency of 5–10 Hz. The shape of the delayed fluorescence curve, the intensity and duration of the afterglow of dye molecules are determined by the ratio of the rates of consumption/regeneration of oxygen content in tissues. A correlation between delayed fluorescence indicators and the clinical and morphological characteristics of tumors has been established, and the application of the results in rapid optical diagnostics of tissues is discussed.

Keywords: photosensitizers, pulse-periodic excitation, singlet oxygen, annihilation, delayed fluorescence, optical diagnostics

УДК 616-006.04-035.1:615.831

КОМБИНИРОВАННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ И ПЛАЗМОННАЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В МОДЕЛИ КРЫС С ПЕРЕВИТЫМИ ОПУХОЛЯМИ

© 2024 г. А.Б. Бучарская*, **, ***,#, Н.А. Наволокин*, **, Д.А. Мудрак*, Г.Н. Маслякова*, **, Б.Н. Хлебцов****, Н.Г. Хлебцов**, ****, В.Д. Генин**, **, Э.А. Генина**, ****, В.В. Тучин**, ****

*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России,
Б. Казачья ул., 112, Саратов, 410012, Россия

**Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Астраханская ул., 83, Саратов, 410012, Россия

***Национальный исследовательский Томский государственный университет,
просп. Ленина, 36, Томск, 634050, Россия

****Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»,
просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049, Россия

#E-mail: allaalla_72@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2024 г.

После доработки 16.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Целью исследования была разработка комбинированной технологии плазмонной фототермической терапии и фотодинамической терапии у крыс с перевитой холангиокарциномой РС-1. Для фотодинамической терапии крысам внутритуморально вводили в дозе 2 мг/кг индоцианиновый зеленый, разведенный в полиэтиленгликоле в соотношении 1:100. Для плазмонной фототермической терапии внутритуморально вводили покрытые полиэтиленгликолем золотые наностержни (400 мкг/мл) в объеме 30% от объема опухоли. Через час после инъекций опухоль облучали чрескожно диодным инфракрасным лазером с длиной волны 808 нм при плотности мощности 2.3 Вт/см² в течение 15 мин. Животных выводили из эксперимента через 72 ч и 21 сутки после терапии. Морфологические исследования опухоли проводили на срезах, окрашенных стандартными и иммуногистохимическими методами. При комбинированной плазмонной фототермической и фотодинамической терапии отмечали значительный подъем температуры опухоли, вплоть до 60.0 ± 4.1°C. Через 72 ч наблюдали выраженные некротические изменения в опухолевой ткани, сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли. Через 21 сутки после терапии отмечали значительное торможение роста опухолей, индекс торможения по массе опухоли составил 77.4%.

Ключевые слова: плазмонная фототермическая терапия, фотодинамическая терапия, золотые наностержни, опухоли, комбинированная терапия.

DOI: 10.31857/S0006302924030205, EDN: ODUSTN

Актуальность разработки новых технологий противоопухолевой терапии обусловлена резким ростом заболеваемости раком в мире. По данным Международного агентства по изучению рака (IARC), в 2020 г. в мире было диагностировано 19.3 млн новых случаев, около 10 млн человек умерло от онкологических заболеваний [1]. Необходимость поиска новых методов лечения обусловлена и недостаточной эффективностью стан-

дартной химио- и лучевой терапии при лечении ряда опухолей, в том числе труднодоступных локализаций.

Наряду с традиционными методами лечения изучается возможность медицинского применения лазерной гипертермии для противоопухолевой терапии, однако основным недостатком данного метода является отсутствие селективности воздействия, за счет чего происходит нагрев здоровых тканей вокруг опухоли.

Для увеличения селективности лазерной гипертермии в последние годы активно используются металлические наночастицы. Плазмонная

Сокращения: ПФТ – плазмонная фототермическая терапия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

фототермическая терапия (ПФТ) — основана на гипертермии опухолей за счет лазерного нагрева металлических наночастиц, обладающих свойством плазмонного резонанса. Наиболее часто для ПФТ используются золотые наночастицы за счет их низкой токсичности. Поглощение света самими биологическими тканями минимально в ближней инфракрасной области (700–1000 нм), поэтому плазмонный резонанс наночастиц должен быть настроен на данный диапазон [2, 3].

При воздействии на накопившиеся в опухоли наночастицы излучением лазера с определенной длиной волны, близкой к их плазмонному резонансу, происходит термолиз опухолевых клеток из-за денатурации белков и разрушения плазматической мембраны, при этом нагрева и повреждения окружающих здоровых тканей не происходит [4].

Однако нерешенными проблемами ПФТ остаются выбор оптимальных доз и методов введения наночастиц для их эффективного накопления в опухолевой ткани; выбор оптимальной мощности и режимов лазерного излучения для улучшения его проникновения в опухолевую ткань. Известно, что золотые наночастицы способны пассивно накапливаться в опухоли благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания (EPR effect) в сосудистой сети [5]. Кроме того, наночастицы избирательно задерживаются в опухолевых тканях вследствие нарушенной системы лимфатического дренажа. Для достижения эффекта пассивного таргетирования наночастицы, как правило, должны иметь размеры 10–200 нм [6, 7].

В связи с сильным поглощением и рассеянием лазерного излучения клетками и тканями *in vivo* важными задачами ПФТ являются доставка света необходимой мощности к тканям-мишеням и в то же время обеспечение безопасности лазерного облучения для здоровых органов [8]. Возможными решениями являются использование соответствующих световодов и методов оптического просветления биотканей [9].

В последние годы активно развиваются технологии комбинированной ПФТ-терапии, в том числе в сочетании с методами фотодинамической терапии (ФДТ), основанной на взаимодействии лазерного излучения с фотосенсибилизатором. Данный метод применяется в клинике уже более 40 лет для лечения различных видов рака, включая поверхностные поражения кожи, опухоли пищевода и легких [10, 11]. Важными преимуществами данной комбинации методов являются сопряженность обоих методов с использованием оптического излучения, ускорение фотохимических реакций при повышении температуры, использование более низких плотностей мощности для лазерного облучения, синергичное воздей-

ствие на опухолевые кровеносные сосуды, разобщенность максимальных терапевтических эффектов обеих процедур во времени, повышение термочувствительности клеток в условиях гипоксии, вызываемой фотохимической реакцией, и т.д. [12, 13].

Авторы работы [14] отметили значительное торможение роста опухолей у мышей при проведении комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием золотых наностержней, конъюгированных с тетрасульфонатом фталоцианина алюминия (AuNR-AlPcS4) [14]. В работе [15] была показана значительная эффективность комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии при внутритуморальном введении золотых нанозвезд, конъюгированных с хлорином е6 (GNS-PEG-Se6) мышам с опухолью MDA-MB-435 и использовании лазера с длиной волны 671 нм.

В исследовании [16] был продемонстрирован противоопухолевый эффект комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием золотых наностержней, конъюгированных с гематопорфирином. При внутритуморальном введении нанокомпозитов крысам с перевитой холангиокарциномой и последовательном облучении опухолей лазерами с длинами волн 808 нм и 633 нм в ткани опухоли развивались выраженные некротические изменения и отмечалось значительное торможение роста опухоли.

В исследовании [17] авторы наблюдали значительное торможение роста опухолей A549 у мышей при проведении комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием 4-карбоксихлорофенилпорфирина, конъюгированного с золотыми наностержнями, покрытыми кремнеземной оболочкой (AuNR@SiO₂-TCPP), и облучении опухолей лазерами с длинами волн 660 и 808 нм.

Однако из-за частого несовпадения спектров поглощения фототермических и фотодинамических агентов комбинированная ПФТ/ФДТ-терапия требует последовательного облучения опухоли двумя разными лазерами, что удлиняет время лечения и усложняет его. Возможным решением данной проблемы является использование лазера с длиной волны, соответствующей спектрам поглощения фототермического и фотодинамического агентов, что позволит оптимизировать терапевтический протокол комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии и уменьшить ее возможные побочные эффекты.

Целью исследования является разработка эффективной комбинированной технологии ПФТ/ФДТ у крыс с перевитой холангиокарциномой РС-1.

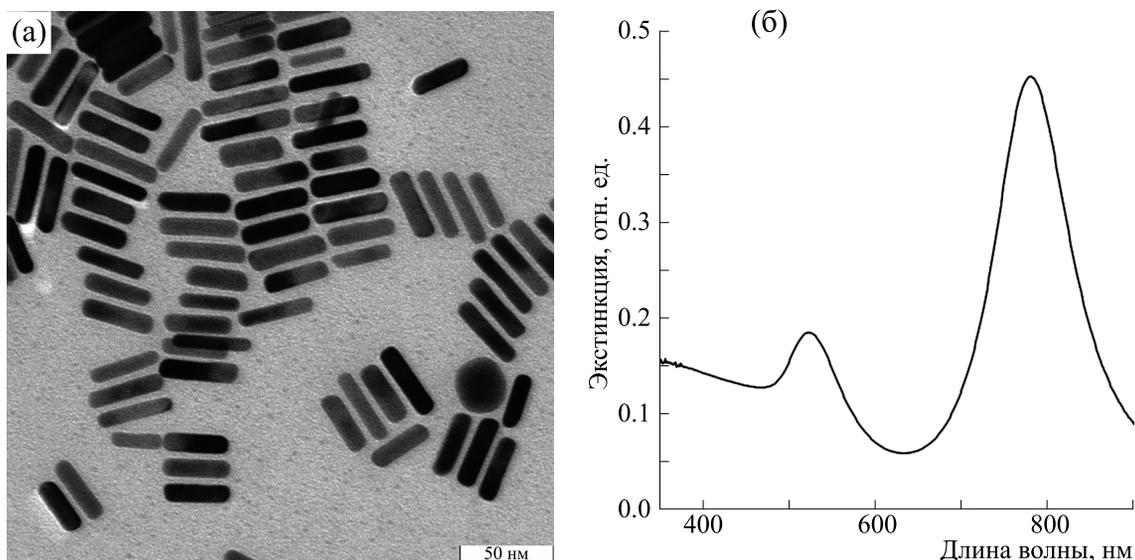


Рис. 1. (а) – ПЭМ-изображения золотых наностержней, (б) – спектр поглощения суспензии золотых наностержней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования на лабораторных животных проводили на базе ЦКП экспериментальной онкологии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского. Штамм холангиокарциномы РС-1 был получен из коллекции НМИЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, 24 крысам-самцам линии Wistar массой 300 ± 30 г вводили подкожно в межлопаточную область по 0.5 мл 25%-ной взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса.

В качестве термосенсибилизатора для ПФТ использовали золотые наностержни, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН зародышевым методом по методике, описанной в работе [18]. Средняя длина частиц $L_{av} = 44.0 \pm 8.3$ нм, диаметр $d_{av} = 10.9 \pm 2.1$ нм и аспектное отношение $AR_{av} = 4.03 \pm 0.72$ были определены из ПЭМ-изображений (просвечивающий электронный микроскоп Libra-120, Carl Zeiss, Германия) (рис. 1а). Для предотвращения агрегации в крови и тканях и повышения биосовместимости наностержни были функционализированы тиолированным полиэтиленгликолем (молекулярная масса 5000 Да, Nektar, США) [19]. Концентрация наностержней в суспензии составляла 400 мкг/мл.

По данным ПЭМ, средняя толщина наностержней варьирует от образца к образцу значительно меньше, чем средняя длина или отношение осей. В частности, относительное среднеквадратичное отклонение диаметра не превышало 3–5%, а относительное среднеквадратичное отклонение длины наночастиц не превышало 10–12%.

Перед измерением коэффициента экстинкции суспензию разбавляли в соотношении 1:10. Спектр коэффициента экстинкции (рис. 1б) регистрировали с помощью UV-Vis-спектрофотометра Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия).

В качестве фотосенсибилизатора для ФДТ использовали индоцианиновый зеленый (Pulsion Medical Inc., Германия), который разводили в соотношении 1:100 в полиэтиленгликоле 300 («Норкем», Россия). В качестве диагностического средства индоцианин зеленый имеет регистрационное удостоверение РФ для медицинского применения (рег. №: ЛП-008003 от 31.03.22).

При достижении опухоли объема 3.0 ± 0.3 см³ животные случайным образом были разделены на 4 группы по 6 крыс: группа сравнения – без воздействия, группа ПФТ, группа ФДТ, группа ПФТ/ФДТ.

В группах животных с ПФТ и ПФТ/ФДТ суспензию золотых наностержней вводили внутритуморально в объеме 30% от объема опухоли. Индоцианиновый зеленый в качестве фотосенсибилизатора вводили внутритуморально в группах животных с ФДТ и комбинированной терапией внутритуморально в дозе 1 мг/кг.

Через час после внутритуморальных инъекций во всех опытных группах крыс опухоль в течение 15 мин облучали чрескожно излучением диодного инфракрасного лазера 808 нм LS-2-N-808-10000 («Лазерные системы», Россия) с плотностью мощности 2.3 Вт/см². Температуру при локальном нагреве кожи над опухолью измеряли тепловизором IRY4010 (IRYSYS, Великобритания). Вывод животных и отбор образцов тканей опухоли для морфологического исследования проводили

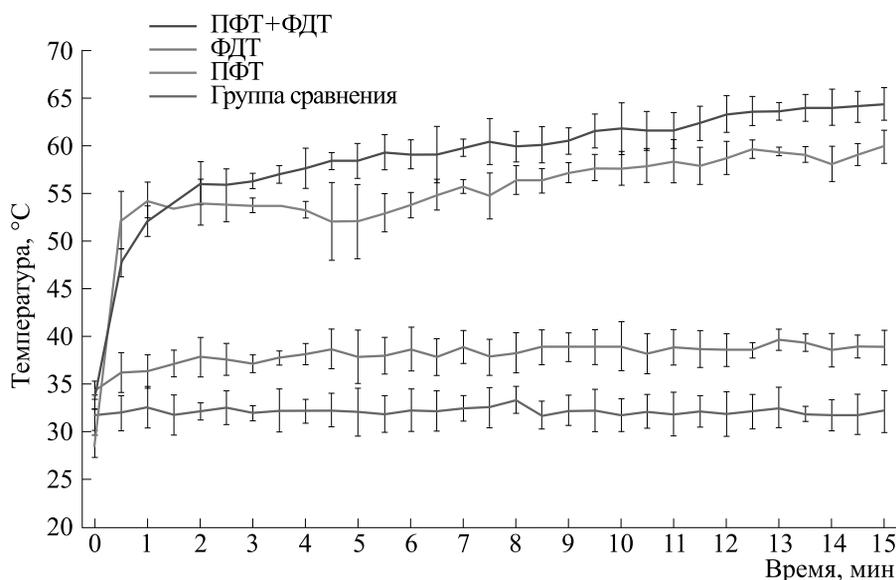


Рис. 2. Динамика температуры локального нагрева опухолей при проведении ПФТ или ФДТ, а также комбинированного ПФТ/ФДТ-воздействия.

через 72 ч и на 21 сутки после проведения терапии. Морфологические исследования проводили на срезах, окрашенных стандартными (гематоксилин-эозин) и иммуногистохимическими методами с использованием системы визуализации UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США) с маркером пролиферации Ki-67 (ab15580, Abcam, Великобритания, разведение 1:100) и маркером апоптоза Вах (ab32503, Abcam, Великобритания, разведение 1:250).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе ПФТ золотые наностержни вводили внутритуморально в объеме 30% от объема опухоли, при воздействии инфракрасного лазерного излучения отмечали выраженный подъем температуры локального нагрева опухоли (вплоть до 60°C), сразу после проведения терапии наблюдали ожоговую поверхность на коже в области воздействия лазера. В группе ФДТ внутритуморально вводили индоцианиновый зеленый в дозе 1 мг/кг, при проведении ФДТ температура повышалась незначительно (до $40 \pm 2^\circ\text{C}$), на поверхности кожи выявлялась лишь зона покраснения.

В группе ПФТ/ФДТ вводили внутритуморально золотые наностержни и индоцианиновый зеленый в том же объеме и дозе, при проведении комбинированной терапии отмечали выраженный подъем температуры локального нагрева опухоли, вплоть до $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Ожоговая поверхность на коже была сопоставима с наблюдаемыми изменениями после ПФТ (рис. 2).

Через 72 ч у крыс после ФДТ отмечали наименее выраженные повреждения ткани опухолей по сравнению с другими опытными группами. При морфологическом исследовании поля некроза занимали от 30 до 50% площади среза. В группах животных с ПФТ и комбинированной ФДТ/ПФТ-терапией некрозы занимали до 80% площади среза опухоли, сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли (рис. 3).

Через 21 сутки после ФДТ в холангиокарциноме часть опухолевых клеток сохраняла свои мембраны, хотя были выражены признаки кариорексиса и кариолизиса, т.е. признаков некробиоза. Поля некрозов составляли около 50% от площади среза.

После ПФТ и комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии отмечали выраженное повреждение ткани опухолей, при морфологическом исследовании поля некроза занимали до 90% площади среза опухоли, участки некрозов наблюдали даже под капсулой опухоли. Сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли (рис. 4).

При иммуногистохимическом исследовании через 72 ч и 21 сутки после проведения ПФТ и комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии отмечали в сохранных клетках опухоли значительное снижение экспрессии маркера пролиферации Ki-67 (рис. 4) и повышение экспрессии ВАХ-маркера апоптоза.

Торможение роста опухолей через 72 ч после терапии во всех опытных группах достоверно не отличалось. Через 21 сутки у крыс наибольшее

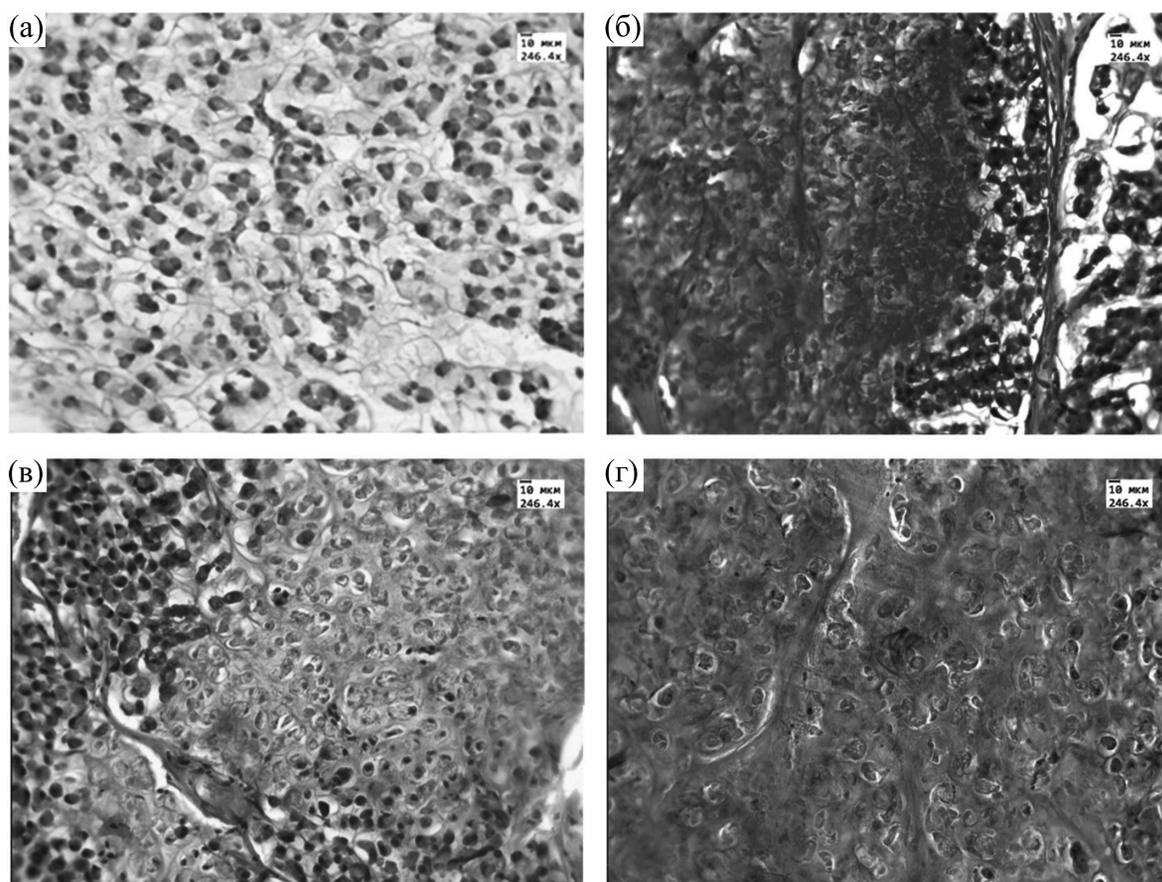


Рис. 3. Морфологическая картина холангиокарциномы через 72 ч после воздействия: (а) – группа сравнения, (б) – после ФДТ-терапии, (в) – после ПФТ-терапии, (г) – после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. 246.4.

торможение роста опухолей было отмечено после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии, индекс торможения роста опухоли по массе составил 77.4% (рис. 5).

Результаты исследования согласуются с данными ряда авторов, которые наблюдали более выраженный эффект на торможение роста опухолей при воздействии комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии при внутритуморальном введении золотых наночастиц в сочетании с различными фотосенсибилизаторами: золотых нанозвезд, конъюгированных с хлорином е6 (GNS-PEG-Se6) [15], золотых наностержней, конъюгированных с гематопорфирином [16], золотых наностержней, конъюгированных с 4-карбоксифенил порфирином [17]. Недостатком этих методик является последовательное применение двух типов лазеров для ФДТ и ПФТ из-за несоответствия спектров поглощения используемых фото- и термосенсибилизаторов.

Сочетание фотосенсибилизатор-термосенсибилизатор было выбрано на основе данных о спектрах поглощения индоцианинового зеленого и золотых наностержней. Индоцианиновый зеле-

ный является трикарбоцианиновым красителем, у которого в зависимости от растворителя и концентрации красителя в растворе максимум поглощения может находиться вблизи 650 нм (димерная форма) или 800 нм (мономерная форма). При использовании в качестве растворителя ПЭГ в растворе красителя преобладают мономеры, и максимум поглощения раствора находится на длине волны 794 нм. В результате связывания молекул индоцианинового зеленого с органическими молекулами биологических тканей его пик поглощения смещается в длинноволновую область до 810 нм [20].

Создание multifunctionальных наноконструктов для комбинированной противоопухолевой терапии, содержащих в своем составе золотые наночастицы и фотосенсибилизаторы с близким спектром поглощения, является перспективным направлением наномедицины. Так, в недавнем исследовании [21] была разработана новая наноплатформа на основе инкапсулированных золотых наностержней, конъюгированных с индоцианиновым зеленым, применение которой для комбинированной ПФТ/ФДТ-тера-

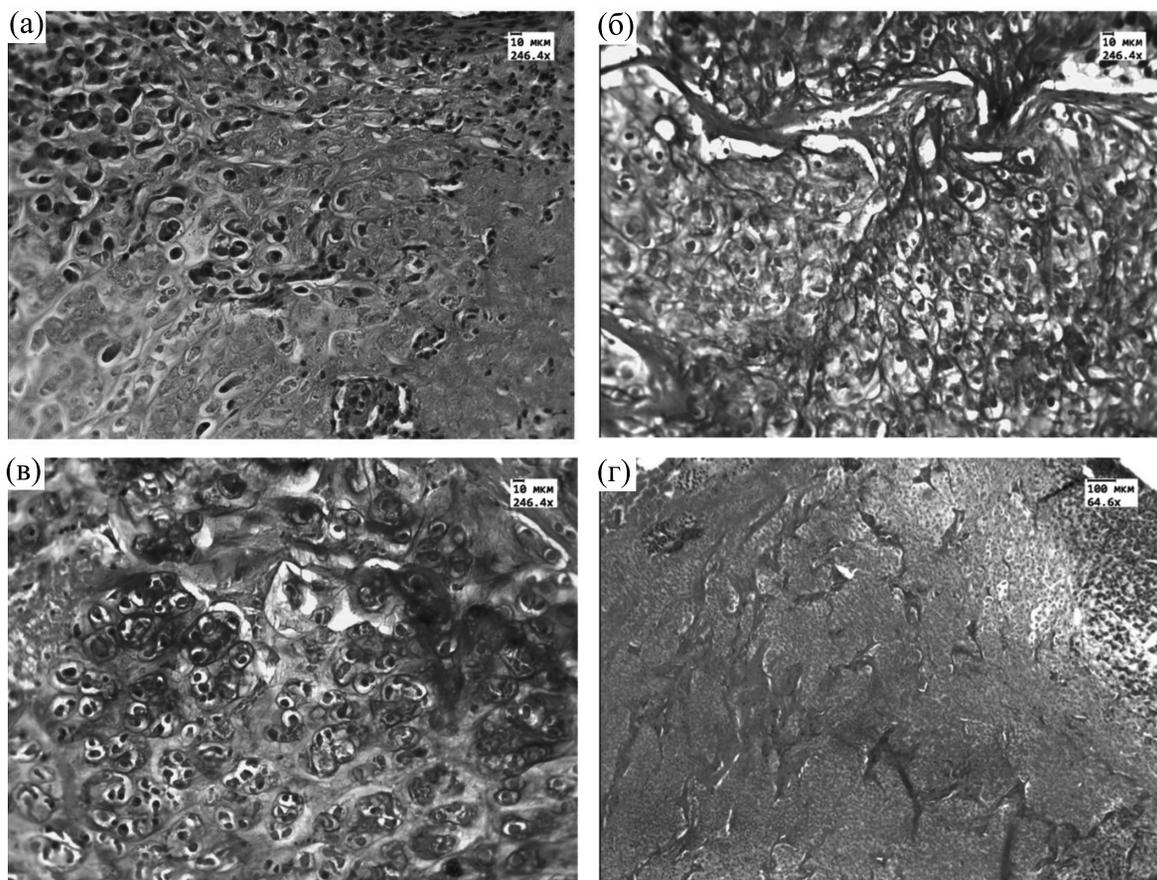


Рис. 4. Морфологическая картина холангиокарциномы через 21 сутки после воздействия: (а) – группа сравнения, ув. 246.4; (б) – после ФДТ-терапии, ув. 246.4; (в) – после ПФТ-терапии, ув. 246.4; (г) – после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии, ув. 64.6. Окрашивание гематоксилин-эозином.

пии у мышей с перевитой опухолью A549 вызывало значительное торможение роста опухолей, по сравнению с группами животных только с ФДТ или ПФТ-терапией. Возможными ограничениями для синтеза такого вида наноконструктов яв-

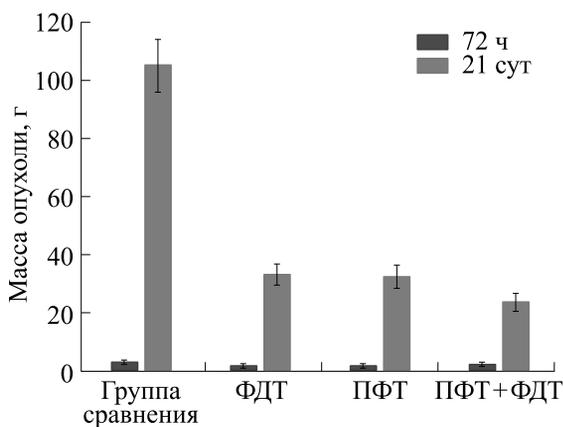


Рис. 5. Масса опухолей через 72 ч и 21 сутки после проведенной терапии.

ляются сложности загрузки в них достаточного количества фотосенсибилизатора для достижения его эффективной концентрации в области интереса при внутривенном введении. В нашем ранее проведенном исследовании мы подобрали необходимые дозы и способ многократного внутривенного введения золотых наностержней для достаточного накопления их в опухоли с сформированной сосудистой сетью и протоколы лазерного облучения для эффективного проведения ПФТ [22]. В настоящем исследовании нами были подобраны необходимые для достижения противоопухолевого эффекта при ФДТ дозы фотосенсибилизатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Близость спектров поглощения фотосенсибилизатора и термосенсибилизатора, имеющих максимумы в области 800–820 нм, позволяет использовать для комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии один инфракрасный лазер (808 нм), что может считаться преимуществом предложенного подхода.

Разработанная комбинированная технология ПФТ/ФДТ-терапии вызывает выраженное повреждение ткани перевитой холангиокарциномы у крыс за счет резкого локального нагрева при ПФТ и цитотоксического действия ФДТ на опухолевые клетки. Противоопухолевое действие предложенной комбинированной технологии превосходит результаты действия при использовании только ПФТ или ФДТ. Этот синергетический эффект можно связать с усиленной диффузией красителя в клетки при повышенной температуре и более эффективной генерации синглетного кислорода и последующей цепочки радикалов молекулами фотосенсибилизатора в сильном локальном поле наночастиц. Однако необходимы дальнейшие исследования как биофизических механизмов комплексного взаимодействия фото- и термосенсибилизаторов, так и безопасности и отдаленных эффектов предложенной терапии.

Дальнейшим направлением исследований может стать разработка многофункциональных наноконструкций, обладающих свойствами направленной доставки действующих агентов в опухоль, на основе золотых наностержней и индоцианинового зеленого для комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось в рамках перспективного научного исследования № SSMU-2022-002 «Разработка технологии комбинированной противоопухолевой плазмонной фототермической и фотодинамической терапии», поддержанного СГМУ им. В.И. Разумовского. Генин В.Д., Генина Э.А. и Тучин В.В. (разработка установки и проведение процедур лазерного облучения опухоли при ПФТ и ФДТ) поддержаны грантом Российского научного фонда № 23-14-00287. Работа Н.Г. Хлебцов и Б.Н. Хлебцова (синтез золотых наностержней) выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на лабораторных животных проводили в соответствии с рекомендациями локального комитета по этике и требованиями международных руководств по использованию лабораторных животных в научных исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cancer today (Globocan 2020) [Electronic resource]. 2020. Mode of access: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Date of access: 05.01.2024.
2. Huang X., Jain P. K., El-Sayed I. H., and El-Sayed M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.*, **23** (3), 217 (2008). DOI: 10.1007/s10103-007-0470-x
3. Kim M., Lee J.-H., and Nam J.-M. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv. Sci.*, **6**, 19004712019 (2019). DOI: 10.1002/advs.201900471
4. Vines J. B., Yoon J.-H., Ryu N.-E., Lim D.-J., and Park H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.*, **7**, 1 (2019). DOI: 10.3389/fchem.2019.00167
5. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control Release*, **65** (1–2), 271 (2000). DOI: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5
6. Park J., Choi Y., Chang H., Um W., Ryu J. H., and Kwon I. C. Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment. *Theranostics*, **9** (26), 8073 (2019). DOI: 10.7150/thno.37198
7. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Pers. Med.* **11**, 771 (2021). DOI: 10.3390/jpm11080771
8. Akhter F., Manrique-Bedoya S., Moreau C., Smith A. L., Yusheng F., Mayer K. M., and Hood R. L. Assessment and Modeling of Plasmonic Photothermal Therapy Delivered via a Fiberoptic Microneedle Device Ex Vivo. *Pharmaceutics*, **13** (12), 2133 (2021). DOI: 10.3390/pharmaceutics13122133
9. Bucharskaya A. B., Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N., Maslyakova G. N., Navolokin N. A., Genin V. D., Genina E. A., and Tuchin V. V. Photothermal and Photodynamic Therapy of Tumors with Plasmonic Nanoparticles: Challenges and Prospects. *Materials*, **15** (4), 1606 (2022). DOI: 10.3390/ma15041606
10. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., and Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, **106**, 1098 (2018). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
11. Gurcan G., Emre G. M., and Seylan A. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front. Chem.*, **9**, 691697 (2021). DOI: 10.3389/fchem.2021.691697
12. Younis M. R., Wang C., An R., Wang S., Younis M. A., Li Z. Q., Wang Y., Ihsan A., Ye D., and Xia X. H. Low Power Single Laser Activated Synergistic Cancer Phototherapy Using Photosensitizer Functionalized Dual Plasmonic Photothermal Nanoagents. *ACS Nano*, **13** (2), 2544 (2019). DOI: 10.1021/acsnano.8b09552

13. Kong C. and Chen X. Combined Photodynamic and Photothermal Therapy and Immunotherapy for Cancer Treatment: A Review. *Int. J. Nanomedicine*, **17**, 6427 (2022). DOI: 10.2147/IJN.S388996
14. Jang J. Y., Park C. H., Tung Kim I.-H., and Choi Y. Gold Nanorod–Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo. *ACS Nano*, **5** (2), 1086 (2011). DOI: 10.1021/nn102722z
15. Wang S., Huang P., Nie L., Xing R., Liu D., Wang Z., Lin J., Chen S., Niu G., Lu G., and Chen X. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Adv. Mater.*, **1** (2), 90 (2013). DOI: 10.1002/adma.201204623
16. Terentyuk G., Panfilova E., Khanadeev V., Chumakov D., Genina E., Bashkatov A., Tuchin V., Bucharshkaya A., Maslyakova G., Khlebtsov N., and Khlebtsov B. Gold nanorods with a hematoporphyrin-loaded silica shell for dual-modality photodynamic and photothermal treatment of tumors in vivo. *Nano Res.*, **7**, 325 (2014). DOI: 10.1007/s12274-013-0398-3
17. Zhang S., Lv H., Zhao J., Cheng M., and Sun S. Synthesis of porphyrin-conjugated silica-coated Au nanorods for synergistic photothermal therapy and photodynamic therapy of tumor. *Nanotechnology*, **30** (26), 265102 (2019). DOI: 10.1088/1361-6528/ab0bd1
18. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., and Khlebtsov N. G. Observation of Extra-High Depolarized Light Scattering Spectra from Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C*, **112**, 12760–12768 (2008).
19. Khlebtsov B. N., Tuchina E. S., Khanadeev V. A., Panfilova E. V., Petrov P. O., Tuchin V. V., and Khlebtsov N. G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin. *J. Biophoton.*, **6**, 338–351 (2013). DOI: 10.1002/jbio.201200079
20. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Кочубей В. И., Тучин В. В. и Альтшулер Г. Б. In vivo исследование взаимодействия индоцианина зеленого с эпидермисом человека. *Письма в ЖТФ*, **27** (14), 63 (2001).
21. Gong B., Shen Y., Li H. Li X., Huan X., Zhou J., Chen Y., Wu J., and Li W. Thermo-responsive polymer encapsulated gold nanorods for single continuous wave laser-induced photodynamic/photothermal tumour therapy. *J. Nanobiotechnol.*, **19**, 41 (2021). DOI: 10.1186/s12951-020-00754-8
22. Bucharshkaya A. B., Maslyakova G. N., Chekhonatskaya M. L., Terentyuk G. S., Navolokin N. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., and Tuchin V. V. Plasmonic Photothermal Therapy: Approaches to Advanced Strategy. *Lasers Surg. Med.*, **50**, 1025–1033 (2018). DOI: 10.1002/lsm.23001

Photodynamic and Plasmonic Photothermal Combination Therapy in a Rat Model of Transplanted Tumors

A.B. Bucharshkaya*, **, ***, **N.A. Navolokin***, **, **D.A. Mudrak***, **G.N. Maslyakova***, **, **B.N. Khlebtsov******, **N.G. Khlebtsov****, ****, **V.D. Genin****, ***, **E.A. Genina****, ***, and **V.V. Tuchin****, ***

**V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, B. Kazachya ul. 112, Saratov, 410012 Russia*

***National Research Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia*

****National Research Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia*

*****Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, prosp. Entusiastov 13, Saratov, 410049 Russia*

The aim of this study is to develop a combined technology which integrates plasmonic photothermal therapy and photodynamic therapy of transplanted cholangiocarcinoma PC-1 in rats. For photodynamic therapy, rats received intratumoral injection of 2 mg/kg indocyanine green diluted in a 1:100 volume ratio with polyethylene glycol. For plasmonic photothermal therapy, the intratumoral injectate volume of gold nanorods (400 µg/ml) coated with polyethylene glycol for tumor was drawn up to be 30% to the tumor volume. One hour after injections, the tumor was irradiated percutaneously with an 808 nm infrared diode laser at a power density of 2.3 W/cm² for 15 min. Animals were excluded from the experiment 72 and 21 days after therapy. Morphological studies of the tumor were performed on sections stained by standard protocols and immunohistochemical methods. A significant rise in tumor temperature, up to 60 ± 4.1°C, was noted during plasmonic photothermal therapy combined with photodynamic therapy. In 72 hours, the pronounced necrotic changes in the tumor tissue were observed, the residual tumor cell foci were found only in the periphery of the tumor. A significant inhibition of tumor growth was observed 21 days after therapy; the tumor growth inhibition index by tumor mass was 77.4%.

Keywords: plasmonic photothermal therapy, photodynamic therapy, gold nanorods, tumors, combination therapy

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА СЛЮНЫ НА НАПРАВЛЕННОСТЬ БИФЕРМЕНТНОГО БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

© 2024 г. В.В. Малышева*, Л.В. Степанова*, А.М. Вышедко*, Л.В. Бельская**, Е.А. Сарф**,
З. Халджанова*, О.А. Коленчукова*, ***, ****, В.А. Крагасюк*, *****

*Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

**Омский государственный педагогический университет, наб. им. Тухачевского, 14, Омск, 644099, Россия

***Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФИЦ
«Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»,
ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022, Россия

****Красноярский государственный аграрный университет», 660049, Красноярск, пр. Мира, 90, Россия

*****Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

#E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 15.01.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Исследована слюна спортсменов с анаэробной (легкоатлеты) и аэробной (пловцы) физической нагрузкой. Слюна отобрана до (состояние физического покоя) и после тренировки. Определено, что физические нагрузки достоверно повышали концентрацию общего белка в слюне и водородный показатель (рН) слюны спортсменов. Активность каталазы в слюне достоверно повышена лишь после аэробной физической нагрузки в отличие от анаэробной. Биоломинесцентный показатель слюны достоверно повышен для спортсменов, занятых аэробной физической нагрузкой по сравнению с анаэробной. Значимое влияние на усиление светоизлучения в биоломинесцентной биферментной реакции способны оказывать такие биомаркеры слюны, как концентрация лактата и общего белка, активность каталазы, концентрация ионов кальция, калия, магния и содержание амидов группы IV. Содержание амидов группы IV и комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатазы, фосфолипидов в слюне спортсменов, занятых анаэробной физической нагрузкой, способны сильнее ингибировать биоломинесцентное свечение, чем концентрация триеновых конъюгатов и содержание амидов группы II в слюне спортсменов, занимающихся аэробной физической нагрузкой. Таким образом, в слюне спортсменов, занятых аэробной или анаэробной физической нагрузкой, выявлены значимые биомаркеры физиологического состояния организма, которые способны оказывать влияние на интегральный ответ биоломинесцентного ферментативного биотеста. Изменение интегрального биоломинесцентного показателя слюны в зависимости от вида физической нагрузки для спортсмена может быть использовано в спортивной медицине для профилактики физических перегрузок.

Ключевые слова: ферментативный биоломинесцентный биотест, биохимический анализ, ИК-Фурье-спектроскопия, слюна, аэробная и анаэробная физическая нагрузка, спортивная медицина.

DOI: 10.31857/S0006302924030215, EDN: ODHJJ

Основными факторами, влияющими на изменение функционального состояния спортсменов, являются вид и уровень двигательной активности и в частности ведущий механизм ее энергообеспечения: анаэробный (без участия кислорода) или аэробный (с потреблением кислорода). Вопрос об особенностях регуляции функциональ-

ного состояния организма в процессе адаптации к физическим нагрузкам анаэробной и аэробной направленности в настоящее время изучен недостаточно [1].

В настоящее время современная наука активно занимается разработкой новых интегральных неинвазивных технологий для оценки функционального состояния организма. Слюна хорошо подходит в качестве неинвазивного биологиче-

Сокращение: ИК – инфракрасный.

ского материала для обследования состояния организма спортсмена во время физической нагрузки разной интенсивности. Показано, что при физической нагрузке изменяется не только биохимический состав слюны (содержание органических и неорганических и минеральных компонентов), а также уровень гормонов и ферментов [2–6].

Анализ слюны имеет ряд преимуществ: неинвазивный сбор биоматериала, длительное хранение, доступность методов лабораторного анализа [7–10] и малый объем проб для таких методов, как спектроскопические методы, капиллярный электрофорез, кристаллографический метод, хемилюминесцентный и иммунный анализ [11–15]. Связь между биохимическим составом слюны и физиологическим состоянием организма обуславливает ее диагностический потенциал.

В работе представлены результаты тестирования слюны спортсменов с помощью бактериального биолюминесцентного ферментативного биотеста [16–19], который позволяет определить влияние компонентов слюны на интенсивность свечения биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза), где результат оценивается интегрально по величине остаточного свечения [20, 21].

Для эффективного применения биолюминесцентного метода с целью контроля функционального состояния организма спортсмена необходимо оценить влияние каждого компонента слюны на биолюминесцентную реакцию, что ранее никем не изучалось. Биолюминесцентный анализ слюны позволит понять механизмы адаптации организма спортсмена к нагрузкам и разработать чувствительный персонифицированный метод профилактики физических перегрузок.

Таким образом, целью работы являлось определение значимых компонентов слюны – биомаркеров физиологического состояния организма у спортсменов с анаэробной или аэробной направленностью физических нагрузок, способных оказывать влияние на интегральный ответ биолюминесцентного ферментативного биотеста.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В исследовании принимали участие студенты Сибирского государственного университета физической культуры и спорта, которые профессионально занимались спортом ($n = 50$). Тестируемые спортсмены находились в возрасте 21–25 лет.

Спортсмены были разделены на две группы в зависимости от вида физической нагрузки: аэробный вид нагрузки (пловцы) ($n = 25$) и анаэробный вид нагрузки (легкоатлеты) ($n = 25$).

В качестве биологического материала для исследования использовали слюну спортсменов. Нестимулированная слюна отбиралась до (контрольный образец) и после (экспериментальный образец) тренировки путем самостоятельного сплевывания в стерильную пробирку в количестве 2 мл. Нативную слюну центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин (центрифуга Model 5810g, Eppendorf, Германия). Супернатант замораживали и хранили в морозильной камере при температуре -18°C . Для анализа использовали размороженную слюну.

Реактивы и приборы. Количественные показатели биохимического состава слюны определяли по общепринятым стандартным методикам, адаптированным к слюне, с использованием наборов реагентов для лабораторной диагностики («Вектор-Бест», Новосибирск).

Содержание общего белка (г/л) определяли спектрофотометрическим методом по реакции с пирогаллоловым красным, содержание лактата (ммоль/л) – ферментативным методом, активность каталазы (мкат/л) – по методу М.А. Королюка, активность супероксиддисмутазы (усл. ед.) – по уменьшению скорости реакция автоокисления адреналина [22]. Содержание субстратов для процессов липопероксидации (диеновых конъюгатов (нмоль/мл), триеновых конъюгатов (нмоль/мл) и оснований Шиффа (нмоль/мл)) определяли спектрофотометрическим анализом по методу И.А. Волчегорского [23].

Концентрацию ионов аммония (NH_4^+), калия (K^+), натрия (Na^+), магния (Mg^{2+}) и кальция (Ca^{2+}) определяли при помощи спектрофотометрического детектирования на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Санкт-Петербург).

ИК-Фурье-спектрометрию проводили на высушенных образцах слюны. Образцы слюны объемом 50 мкл высушивали в течение 30 мин на подложке из селенида цинка в термостате при 37°C . Инфракрасные (ИК) спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» («Симекс», Новосибирск) в диапазоне $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Запись спектров проводили с числом сканов 32 с разрешением 4 см^{-1} . Измерение фона (воздуха) проводили для каждого обработанного образца. Пики, соответствующие колебаниям CO_2 , удаляли с помощью опции «генерация прямых» в программе ZaIR 3.5 («Симекс», Новосибирск). Для каждого образца сравнивали три спектра. Результаты были представлены в виде усредненного спектра. На ИК-спектрах поглощения всех образцов определяли интенсивность полос поглощения аминов группы А, I, II, III, IV; фосфолипидов; тиоцианатов; нуклеиновых кислот; метиленовые группы боковых цепей олигос-

ахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов; метиленовых группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков.

Водородный показатель (рН) слюны определяли на лабораторном рН-метре «Эксперт-рН (микро)» («Эконикс-Эксперт», Москва).

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум» (НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск), который содержал фермент люциферазу из рекомбинантного бактериального штамма *Escherichia coli* и НАДН:ФМН-оксидоредуктазу из бактериальной культуры *Vibrio fischeri*, а также субстраты – 0.05 М калий-фосфатный буфер (рН 6.8–7.0), 0.4 мМ буферный раствор никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) (рН 6.8–7.0) (Sigma, США), 0.0025% спиртовой раствор тетрадеканала (C_{14}) (Sigma, США), совместно иммобилизованные в высушенный крахмальный гель. Катализатором биолюминесцентной реакции служил 0.5 мМ водный раствор флавиномононуклеотида (Serva, Германия).

Биолюминесцентное свечение регистрировали в сине-зеленой области (длина волны 470 нм) на портативном люминометре «Люмишот» (НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск).

Методика биолюминесцентного тестирования слюны включала в себя проведение контрольного и экспериментального измерений.

Для проведения контрольного измерения в кювету последовательно вносили один реагент, 300 мкл буфера, 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида. Экспериментальное измерение проводили со слюной, когда 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны, т.е. в кювету последовательно вносили один реагент, 260 мкл буфера, 40 мкл слюны и 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида. Регистрировали максимальную интенсивность свечения.

Измерения каждого образца слюны выполняли в трех повторностях. Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (T , %) (интегральный биолюминесцентный показатель) как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (I) к контролю (I_0), умноженного на 100%:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\%.$$

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Описание выборки производили с помощью подсчета моды (Mo) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей [С25–С75]. Различия между зависимыми группами оценивали по критерию Вилкоксона, между независимыми груп-

пами – по критерию Манна–Уитни, корреляционный анализ – по критерию Спирмена. Многофакторный анализ проведен с использованием дисперсионного анализа (ANalysis Of VAriance (ANOVA)). Уровень статистической значимости считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ компонентного состава слюны показал, что физическая нагрузка достоверно повышала рН ($p < 0.001$) и концентрацию общего белка ($p < 0.001$), понижала активность каталазы ($p = 0.02$) по сравнению с показателями до нагрузки (табл. 1). Интенсивность полос поглощения ИК-спектров для различных функциональных групп амидов, сахаров, аминокислот и фосфолипидов до и после физической нагрузки достоверно не различалась (табл. 2).

В настоящее время не выявлено оптимального набора биохимических показателей для определения степени влияния физической нагрузки на организм человека, поскольку различные системы и органы по-разному могут реагировать на физическую нагрузку. Однако известно, что временное изменение показателя рН может быть вызвано интенсивными тренировками в условиях гипоксии. Концентрация общего белка может быть повышена в силу больших физических нагрузок, вследствие большей интенсивности обменных процессов. Ввиду того, что при любой физической нагрузке потребление кислорода в органах возрастает, уровень свободнорадикальных процессов повышен. Вследствие этого может происходить усиленное образование продуктов перекисного окисления липидов, снижающее активность антиоксидантной системы, в частности, активность каталазы [24, 25], что наблюдалось в наших экспериментах.

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны всех обследуемых спортсменов ($n = 50$) не показали достоверных различий между биолюминесцентным показателем до и после физической нагрузки, тогда как в состоянии физического покоя наблюдали повышение величины остаточного свечения ($T = 148.7$ [75.1–183.5]%) и понижение – после нагрузки ($T = 79.8$ [68.8–135.1]%). Современные исследования отмечают изменения компонентного состава слюны после воздействия физической нагрузки [24, 25, 27], однако влияние компонентов слюны на биолюминесцентную биферментную систему не представлено и не ясны причины изменения биолюминесцентного показателя.

Анализ корреляционных взаимосвязей между компонентным составом слюны и величиной остаточного свечения выявил, что повышение усредненного биолюминесцентного показателя в состо-

Таблица 1. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Биохимический и кислотно-щелочной показатель	До физической нагрузки ($n = 50$)	После физической нагрузки ($n = 50$)
Концентрация лактата, ммоль/л	2.4 [1.7–3.6]	3.0 [1.9–5.0]
Концентрация общего белка, г/л	0.4 [0.2–0.6]	0.6 [0.5–0.9] ($p < 0.001$)
Активность каталазы, мкат/л	430236 [326340–488844]	427572 [352980–568764] ($p = 0.02$)
Активность супероксиддисмутазы, усл. ед.	134.2 [60.5–173.7]	121.1 [63.2–205.3]
Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	3.9 [3.7–4.0]	3.9 [3.8–4.0]
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	1.3 [1.2–1.5]	1.3 [1.2–1.5]
Концентрация оснований Шиффа, нмоль/мл	0.5 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.5]
Концентрация ионов аммония (NH_4^+), ммоль/л	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]
Концентрация ионов калия (K^+), ммоль/л	9.7 [6.7–10.7]	9.2 [7.6–11.0]
Концентрация ионов натрия (Na^+), ммоль/л	10.3 [6.7–18.5]	8.5 [6.3–11.1]
Концентрация ионов магния (Mg^{2+}), ммоль/л	0.2 [0.2–0.2]	0.3 [0.2–0.3]
Концентрация ионов кальция (Ca^{2+}), ммоль/л	1.0 [0.7–1.2]	1.1 [0.9–1.2]
pH	6.9 [6.6–7.2]	7.1 [7.0–7.3] ($p < 0.001$)

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей.

Таблица 2. Интенсивность полос поглощения ИК-спектров слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Интенсивность поглощения ИК-спектров, %	До физической нагрузки ($n = 50$)	После физической нагрузки ($n = 50$)
Амид группы А	20.0 [7.34–24.0]	18.6 [11.5–34.4]
Амид группы I	15.8 [1.40–31.6]	8.4 [1.40–31.6]
Амид группы II	30.2 [20.0–47.0]	29.8 [20.0–40.0]
Амид группы IV	65.9 [64.2–69.8]	68.4 [64.2–72.6]
Метиленовые группы липидов слизистой оболочки полости рта	40.0 [32.6–54.4]	44.2 [33.0–53.0]
Тиоцианаты	87.4 [84.6–93.0]	87.4 [84.6–91.6]
Метиленовые группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков	48.4 [38.6–55.0]	47.0 [40.0–60.0]
Фосфолипиды	76.0 [76.0–80.0]	78.5 [78.5–78.6]
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)	45.9 [38.6–50.2]	48.4 [37.2–54.9]
Олигосахариды, полисахариды, фосфатазы, фосфолипиды	89.7 [89.7–93.0]	91.3 [88.8–94.4]

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей.

янии физического покоя обратно взаимосвязано с концентрацией триеновых конъюгатов ($r = -0.4$, $p = 0.05$) и показателем pH слюны ($r = -0.4$, $p = 0.05$), его понижение после нагрузки – с концентрацией триеновых конъюгатов ($r = -0.5$, $p = 0.05$) и ионов магния ($r = 0.4$, $p = 0.05$).

Известно, что организм в состоянии физического покоя содержит приблизительно поровну свободных радикалов и антиоксидантов. Физические нагрузки нарушают равновесие, активных форм кислорода становится больше, возникает окислительный (или оксидативный) стресс. Ве-

роятно, триеновые конъюгаты, которые являются вторичным продуктом перекисного окисления липидов [24, 25], способны оказывать влияние на активность ферментов биолюминесцентной реакции независимо от функционального состояния организма спортсмена. Определено, что ионы магния необходимы для активности одного из ферментов биотеста – люциферазы [26]. Следовательно, корреляционный анализ не позволил выявить значимых компонентов слюны, способных влиять на изменение биолюминесцентного показателя после физической нагрузки.

Многофакторный анализ выявил основные компоненты слюны, способные значимо оказывать влияние на результат биолюминесцентного тестирования (табл. 3). Содержание тиоцианатов (продукты обмена серосодержащих соединений, входящие в состав антимикробной защиты) и концентрация триеновых конъюгатов (вторичный продукт первичных продуктов перекисного окисления липидов) могли оказывать наибольшее воздействие на биолюминесцентную ферментативную реакцию. Наименьшее воздействие, предположительно, оказывали содержание комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов и амида группы II (производные кислородсодержащих кислот, в которых гидроксильная группа кислотного остатка заменена аминогруппой и участвует в полипептидных цепях), а также концентрация лактата. После физической нагрузки содержание амида группы IV в слюне незначительно повышалось, однако его значимое воздействие не выявлено. При этом в состоянии физического покоя (до физической нагрузки) содержание амида группы IV могло оказывать значимое воздействие на биолюминесцентную реакцию.

Известно, что кислотность NH-групп в амиде группы IV выше, чем в амидах других функциональных групп [11, 12, 23]. Возможно, что кислотность явилась возможной причиной не значимого влияния амида группы IV на результат биолюминесцентного тестирования слюны, собранной после физической нагрузки.

Известно, что физическая нагрузка по механизму энергообеспечения организма может быть аэробной и анаэробной направленности и потому способна вызывать изменения разных компонентов слюны [24, 25]. Сравнение отдельных компонентов слюны показало, что в состоянии физического покоя количественные значения биохимических показателей слюны спортсменов, занимающихся аэробной и анаэробной физической нагрузкой, достоверно не различались (табл. 4).

Активность каталазы достоверно повышалась после аэробной нагрузки ($p_{1,2} < 0.001$), и ее значение было достоверно высоким при анаэробной

физической нагрузке ($p_{3,4} < 0.001$) в отличие от аэробной (табл. 4). Достоверно повышены концентрация общего белка ($p_{1,2} = 0.006$ (после аэробной нагрузки), $p_{3,4} < 0.001$ (после анаэробной нагрузки)) и показатель pH ($p_{1,2} < 0.001$ (после аэробной нагрузки), $p_{3,4} = 0.006$ (после анаэробной нагрузки)) в слюне после обоих видов физической нагрузки по сравнению с состоянием физического покоя.

Результаты спектроскопического тестирования слюны показали, что занятия аэробной физической нагрузкой достоверно понижали содержание амидов групп A и IV в слюне ($p_{1,2} = 0.03$ и 0.007 соответственно) и повышали содержание нуклеиновых кислот ($p_{1,2} = 0.02$), комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($p_{1,2} = 0.02$) по сравнению с состоянием физического покоя (табл. 5).

Занятия анаэробной физической нагрузкой достоверно повышали содержание амидов групп I и II в слюне ($p_{3,4} = 0.004$ и 0.01 соответственно) и понижали содержание метиленовых групп белков, аминокислот, липидов ($p_{3,4} = 0.04$) по сравнению с состоянием физического покоя.

Следовательно, анаэробная физическая нагрузка, в отличие от аэробного вида, снижала активность антиоксидантной системы и содержание групп белков, аминокислот, липидов в слюне, что характеризовало высокую физическую активность организма спортсмена [24, 25].

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны спортсменов, занимающихся аэробной и анаэробной физической нагрузкой, существенно не различались в состоянии физического покоя ($T = 98.8$ [93.1–160.1]% до аэробной нагрузки и $T = 78.4$ [67.5–130.5]% – до анаэробной) и достоверно отличались после нагрузки ($p = 0.004$) (рис. 1). Слюна спортсменов после аэробной физической нагрузки усиливала биолюминесцентное свечение ($T = 148.7$ [100.1–208.5]%) и тушила свечение ($T = 47.1$ [63.7–137.4]%) после анаэробной физической нагрузки. Следовательно, на изменение биолюминесцентного свечения ферментативной реакции могли влиять количественные показатели отдельных компонентов слюны спортсменов.

Однако многофакторный анализ не выявил значимых компонентов слюны, способных влиять на биолюминесцентную реакцию.

Анализ корреляционных взаимосвязей между количественными показателями компонентов слюны и биолюминесцентным показателем выявил значимые маркеры, способные воздействовать на биолюминесцентную ферментативную реакцию.

Таблица 3. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки, значимо влияющий на биолюминесцентную реакцию (по критерию Фишера)

Биохимический показатель	Значения критерия Фишера при уровне значимости $p < 0.05$	
	до физической нагрузки	после физической нагрузки
Содержание тиоцианатов, %	12.9 ($p < 0.001$)	11.7 ($p = 0.002$)
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	6.5 ($p = 0.02$)	6.1 ($p = 0.02$)
Содержание олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов, %	4.6 ($p = 0.04$)	4.6 ($p = 0.04$)
Содержание амида группы II, %	4.3 ($p = 0.05$)	4.1 ($p = 0.07$)
Концентрация лактата, ммоль/л	3.7 ($p = 0.07$)	3.7 ($p = 0.07$)
Содержание амида группы IV, %	3.1 ($p = 0.09$)	–

Таблица 4. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Биохимический и кислотно-щелочной показатель	Аэробная нагрузка ($n = 25$)		Анаэробная нагрузка ($n = 25$)	
	до тренировок	после тренировок	до тренировок	после тренировок
Концентрация лактата, ммоль/л	2.6 [1.6–3.6]	2.4 [1.6–4.6]	2.3 [1.7–3.7]	3.6 [2.1–5.7]
Концентрация общего белка, г/л	0.3 [0.2–0.6]	0.6 [0.4–0.9] ($p_{1,2} = 0.006$)	0.4 [0.2–0.6]	0.7 [0.5–0.9] ($p_{3,4} < 0.001$)
Активность каталазы, мкат/л	298368 [255744–378288]	354312 [293040–400266] ($p_{1,2} < 0.001$)	485514 [447552–579420]	572760 [532800–679320] ($p_{2,4} < 0.001$)
Активность супероксиддисмутазы, усл. ед.	139.5 [76.3–163.2]	188.2 [105.3–227.6]	127.6 [42.1–205.3]	73.7 [50.0–121.1]
Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	3.9 [3.8–4.1]	4.0 [3.9–4.1]	3.8 [3.7–4.0]	3.8 [3.7–3.9]
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	1.3 [1.2–1.3]	1.2 [1.2–1.4]	1.4 [1.3–1.5]	1.4 [1.3–1.5]
Концентрация оснований Шиффа нмоль/мл	0.5 [0.4–0.5]	0.5 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.4]
Концентрация ионов аммония (NH_4^+), ммоль/л	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]
Концентрация ионов калия (K^+), ммоль/л	7.3 [5.4–10.3]	7.7 [6.1–10.6]	9.9 [8.6–10.8]	9.7 [8.3–11.7]
Концентрация ионов натрия (Na^+), ммоль/л	8.8 [4.4–18.5]	7.9 [4.8–12.6]	12.5 [9.1–18.9]	8.7 [7.3–11.1]
Концентрация ионов магния (Mg^{2+}), ммоль/л	0.2 [0.2–0.5]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.2–0.3]	0.2 [0.1–0.3]
Концентрация ионов кальция (Ca^{2+}), ммоль/л	0.8 [0.6–1.2]	1.1 [0.9–1.2]	1.1 [0.8–1.2]	1.1 [0.8–1.3]
pH	7.0 [6.6–7.2]	7.2 [7.0–7.4] ($p_{1,2} < 0.001$)	6.9 [6.6–7.3]	7.0 [6.9–7.2] ($p_{3,4} = 0.006$)

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей.

Таблица 5. Интенсивность полос поглощения ИК-спектров слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Интенсивность поглощения ИК-спектров, %	Аэробная нагрузка ($n = 25$)		Анаэробная нагрузка ($n = 25$)	
	до тренировки	после тренировки	до тренировки	после тренировки
Амид группы А	29.8 [11.6–64.2]	15.2 [11.9–22.9] ($p_{1,2} = 0.03$)	16.5 [4.2–31.2]	33.0 [11.5–44.2]
Амид группы I	15.8 [1.4–34.4]	4.9 [1.4–13.0]	14.4 [1.4–31.6]	25.6 [1.4–33.0] ($p_{3,4} = 0.004$)
Амид группы II	35.8 [24.2–48.8]	30.2 [21.4–37.2]	25.6 [15.8–35.8]	27.0 [20.0–47.2] ($p_{3,4} = 0.01$)
Амид группы IV	65.9 [57.2–71.2]	65.6 [57.2–69.8] ($p_{1,2} = 0.007$)	65.9 [65.6–68.4]	69.8 [68.4–74.0]
Метиленовые группы липидов слизистой оболочки полости рта	48.4 [33.0–58.6]	40.9 [33.7–51.6]	37.9 [27.4–47.0]	45.6 [31.2–53.0]
Тиоцианаты	90.2 [84.6–93.0]	88.8 [86.0–94.4]	87.1 [82.8–90.2]	86.0 [83.2–90.2]
Метиленовые группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков	48.8 [44.2–57.2]	47.7 [38.6–60.0]	45.8 [37.2–53.0]	45.6 [40.0–57.2] ($p_{3,4} = 0.04$)
Фосфолипиды	76.0 [71.6–77.2]	78.5 [74.7–78.5]	76.0 [76.0–80.0]	78.6 [78.5–82.8]
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)	45.9 [40.0–60.0]	46.4 [35.1–54.6] ($p_{1,2} = 0.02$)	45.9 [33.0–48.4]	48.4 [43.4–55.3]
Олигосахариды, полисахариды, фосфатазы, фосфолипиды	89.7 [89.7–93.0]	91.3 [88.1–94.4] ($p_{1,2} = 0.02$)	89.7 [88.8–93.0]	91.3 [89.8–94.4]

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей.

В состоянии физического покоя биolumинесцентный показатель слюны спортсменов с аэробной физической нагрузкой обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.6$, $p = 0.04$), амидов группы IV ($r = -0.4$, $p = 0.03$), концентрацией диеновых конъюгатов ($r = -0.4$, $p = 0.04$) и показателем pH ($r = -0.5$, $p = 0.02$); для спортсменов, занимающихся анаэробным видом нагрузки – с содержанием олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($r = -0.4$, $p = 0.04$) и амидов группы А ($r = -0.4$, $p = 0.04$). Следовательно, выявлены лишь компоненты слюны, способные значимо оказывать влияние на ингибирование биolumинесцентной ферментативной реакции, к ним отнесены тиоцианаты, диеновые конъюгаты, комплекс олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов и амиды групп А и IV.

После аэробной физической нагрузки биolumинесцентный показатель слюны спортсменов положительно коррелировал с концентрацией лактата ($r = 0.4$, $p = 0.04$), общего белка ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов кальция ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов калия ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов магния ($r = 0.4$, $p = 0.04$); активностью каталазы ($r = 0.5$, $p = 0.03$) и обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.6$, $p = 0.03$), метиленовыми группами аминокислот, липидов и белков ($r = -0.5$, $p = 0.04$). Следовательно, после аэробной физической нагрузки на повышение интенсивности свечения биolumинесцентной биферментной реакции могли оказывать возможное влияние активность каталазы, концентрация лактата, общего белка, ионов кальция, калия, магния, на ингибирование – содержание тиоцианатов и метиленовых групп аминокислот, липидов.

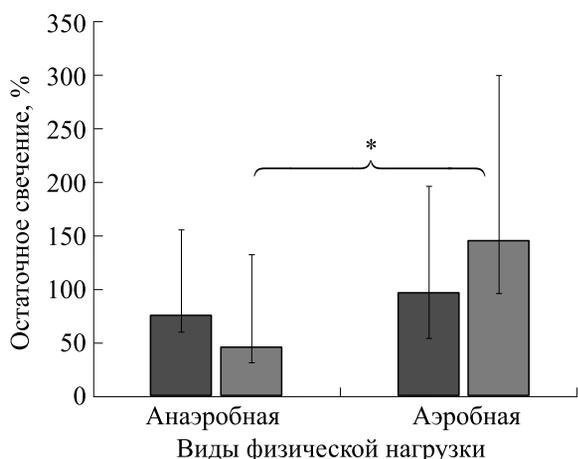


Рис. 1. Изменение интенсивности светоизлучения биоломинесцентной реакции при воздействии слюны спортсменов, отобранной до и после анаэробной ($n = 25$) и аэробной ($n = 25$) физической нагрузки. * – Достоверность различий между показателями после анаэробной и аэробной нагрузки ($p = 0.004$).

После анаэробной физической нагрузки биоломинесцентный показатель слюны спортсменов положительно коррелировал с концентрацией общего белка ($r = 0.6, p = 0.04$) и содержанием амидов группы IV ($r = 0.4, p = 0.04$) и обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.4, p = 0.04$) и комплексом олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($r = -0.4, p = 0.04$).

Следовательно, после анаэробной физической нагрузки на усиление светоизлучения в биоломинесцентной биферментной реакции могли оказывать возможное влияние такие показатели, как концентрация общего белка и содержание амидов группы IV, на тушение свечения – содержание тиоцианатов и комплекс олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов.

Таким образом, предполагаем, что во время интенсивной физической нагрузки происходило изменение кислотно-щелочного баланса слюны, что способствовало накоплению продуктов перекисного окисления липидов, которые в свою очередь способны оказывать ингибирующее воздействие на биоломинесцентную реакцию. Возможными биомаркерами функционального состояния организма спортсмена во время занятий анаэробной или аэробной физической нагрузкой, которые способны оказывать влияние на биоломинесцентную ферментативную реакцию, могут быть лактат, каталаза общий белок, ионы кальция, калия и магния, амиды группы IV, тиоцианаты, комплекс олигосахаридов и полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов. Для выявления значимого вклада отдельных компонент слюны на усиление или ослабление биоломинесцентной ферментативной биоломинесцентной реак-

ции необходимо продолжить исследование на большой выборке обследуемых.

Учитывая неинвазивность, простоту и возможность многократного тестирования, биоломинесцентный анализ слюны спортсменов, занимающихся разными видами физической нагрузки, можно использовать в качестве перспективного метода для оценки адаптации организма спортсмена к нагрузкам. На основе усиления или ослабления биоломинесцентного свечения биферментной системы при воздействии отдельных компонент слюны, которые будут количественно изменяться при разных видах физической нагрузки, можно разработать чувствительный персонифицированный метод профилактики физических перегрузок.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация общего белка и показатель pH были повышены в слюне независимо от вида физической нагрузки (аэробной и анаэробной). Повышенный уровень активности каталазы в слюне отличал аэробную физическую нагрузку от анаэробной.

2. Биоломинесцентный показатель слюны повышен для спортсменов, занятых аэробной физической нагрузкой, и понижен – для спортсменов с анаэробной нагрузкой.

3. Значимое влияние на усиление интенсивности свечения биоломинесцентной биферментной реакции способны оказывать такие маркеры слюны, как концентрация лактата, активность каталазы, концентрация общего белка, ионов кальция, ионов калия, ионов магния и содержание амидов группы IV.

4. Содержание тиоцианатов совместно с комплексом олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов в слюне спортсмена может способствовать ингибированию биоломинесцентного свечения биферментной реакции, независимо от вида выполняемой им физической нагрузки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность спортсменам и тренерам Сибирского государственного университета физической культуры и спорта, оказавшим помощь в проведении исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Методика биоломинесцентного тестирования слюны разработана при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-10039, <https://rscf.ru/project/23-25-10039>) сов-

местно с Красноярским краевым фондом науки (Красноярский край).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера протокол № 11 от 10.10.2023 года. В начале тестирования от испытуемых получено письменное информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлов С. С. и Розенгарт Е. В. Слюна как объект биохимического контроля в спорте. *Ученые записки ун-та им. П. Ф. Лесгафта*, **6**, 57–61 (2008).
2. Турлак И. В. Слюна – основные направления исследования ее свойств. *Современные проблемы науки и образования*, № 4, 154–164 (2020).
3. Бельская Л. В., Голованова О. А., Турманидзе В. Г. и Шукайло Е. С. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов. *Омский науч. вестн.*, **6** (102), 175–178 (2011).
4. Bel'skaya L. V. and Sarf E. A. The use of IR Fourier spectroscopy of saliva for rapid assessment of the level of lipid peroxidation products. *Biomed. Chem, Res. & Methods*, **2** (2), e00094 (2019). DOI: 10.18097/BMCRM00094
5. Bel'skaya L. V. Application of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Bull. Sci. & Practice*, **2** (15), 132–140 (2017). DOI: 10.5281/zenodo.291849
6. Бельская Л. В., Голованова О. А., Шукайло Е. С. и Турманидзе В. Г. Экспериментальное исследование кристаллизации биологических жидкостей. *Вестн. Отделения наук о Земле РАН*, **3**, NZ6012 (2011). DOI: 10.2205/2011NZ000142
7. Hayes L. D., Sculthorpe N., Cunniffe B., and Grace F. Salivary testosterone and cortisol measurement in sports medicine: a narrative review and user's guide for researchers and practitioners. *Int. J. Sports Med.*, **37** (13), 1007–1018 (2016). DOI: 10.1055/s-0042-105649
8. Davies R. H., Corry J. W., and Andrade J. D. Lactate assay based on bacterial bioluminescence: enhancement, dry reagent development, and miniaturization. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 441–444 (2002). DOI: 10.1142/9789812776624_0099
9. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. *Биохимические методы исследования слюны в лабораторной диагностике* (ИНТЕХ, Омск, 2013).
10. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., and Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Arch. Oral Biol.*, **57** (5), 556–566 (2012). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.016
11. Bel'skaya L. V., Sarf E. A., Kosenok V. K., and Massard Zh. Chronophysiological features of the normal electrolyte composition of human saliva. *Ekologiya Cheloveka (Human Ecology)*, **25** (5), 28–32 (2018). DOI: 10.33396/1728-0869-2018-5-28-32
12. Mira A., Artacho A., Camelo-Castillo A., Garcia-Esteban S., and Simon-Soro A. Salivary immune and metabolic marker analysis (SIMMA): A diagnostic test to predict caries risk. *Diagnostics*, **7** (3), 38 (2017). DOI: 10.3390/diagnostics7030038
13. Винник Ю. С., Савченко А. А., Перьянова О. В., Теплякова О. В., Якимов С. В., Тепляков Е. Ю. и Мешкова О. С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа. *Сибирское мед. обозрение*, **40** (3), 3–6 (2006).
14. Liao C., Chen X., and Fu Y. Salivary analysis: An emerging paradigm for non-invasive healthcare diagnosis and monitoring. *Interdisc. Med.*, **1** (3), e20230009 (2023). DOI: 10.1002/INMD.20230009
15. Zhang L., Xiao H., and Wong, D. T. Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol. Diag. Ther.*, **13**, 245–259 (2009). DOI: 10.1007/BF03256330
16. Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kalyabina V. P., and Kratasyuk V. A. Enzymatic biotesting: scientific basis and application. *Contemp. Probl. Ecol.*, **14**, 290–304 (2021). DOI: 10.1134/S1995425521030069
17. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Springer, Berlin, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
18. Kratasyuk V. A. and Esimbekova E. N. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **18** (10), 952–959 (2015). DOI: 10.2174/1386207318666150917100257
19. Esimbekova E. N., Kondik A. M., and Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity. *Environ. Monit. Assess*, **185** (7), 5909–5916 (2013). DOI: 10.1007/s10661-012-2994-1
20. Kratasyuk V. A., Stepanova L. V., Ranjan R., Sutormin O. S., Pande S., Zhukova G. V., and Kolenchukova O. A. A non-invasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' response to physical exertion. *Luminescence*, **36** (2), 384–390 (2020). DOI: 10.1002/bio.3954
21. Stepanova L. V., Vyshedko A. M., Kolenchukova O. A., Zhukova G. V., and Kratasyuk V. A. Use of bioluminescent saliva testing in evaluating of physical preparedness of athletes with different qualifications. *Sib. Med. Rev.*, **1**, 63–69 (2017). DOI: 10.20333/2500136-2017-6-63-69

22. Бельская Л. В., Сарф Е. А. и Косенок В. К. *Биохимия слюны: методы исследования* (Омскбланкиздат, Омск, 2015).
23. Bel'skaya L. V., Kosenok V. K., and Massard G. Endogenous intoxication and saliva lipid peroxidation in patients with lung cancer. *Diagnostics*, **6** (4), 39 (2016). DOI: 10.3390/diagnostics6040039
24. Grzesiak-Gasek I. and Kaczmarek U. Influence of swimming training session on selected saliva components in youth swimmers. *Front. Physiol.*, **13**, 869903 (2022). DOI: 10.3389/fphys.2022.869903
25. Ярушин С. А. Влияние физических нагрузок различной интенсивности на изменение некоторых биохимических показателей в поте и слюне. *Физическая культура. Спорт. Туризм. Двигательная рекреация*, **2** (4), 7–10 (2017).
26. Petushkov V. N., Dubinnyi M. A., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Baranov M. S., Kublitski V. S., Shimomura O., and Yampolsky I. V. A novel type of luciferin from the siberian luminous earthworm fridericia heliota: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53** (22), 5566–5568 (2014). DOI: 10.1002/anie.201400529
27. Yixiao X. U., Yongcai Z. H. A. O., and Binghong G. A. O. Saliva: A potential biological sample for the application in sports training. *J. Shanghai Univ. Sport*, **46** (10), 84–94 (2022). DOI: 10.16099/j.sus.2021.08.25.0002

The Influence of Salivary Constituents on the Activity of Bioluminescent Double Enzyme-Based System Depending on the Type of Physical Exertion

V.V. Malysheva*, L.V. Stepanova*, A.M. Vyshedko*, L.V. Bel'skaya**, E.A. Sarf**, Z. Khaljanova*, O.A. Kolenchukova*, ***, ****, and V.A. Kratasyuk*, *****

*Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Omsk State Pedagogical University, nab. imeni Tukhachevskogo 14, Omsk, 644099 Russia

***Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, ul. Partizana Zheleznyaka 3g, Krasnoyarsk, 660022 Russia

****Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia

*****Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The saliva of athletes participating in anaerobic (track and field athletes) or aerobic (swimmers) physical activity was studied. Saliva sample was collected before (control) and after the workout. It was found that physical activity significantly increased the salivary total protein concentration and pH values in the athletes. The activity of catalase in saliva was significantly increased only after aerobic, but not anaerobic exercise performance. The bioluminescent indicator of athletes' saliva is significantly higher during aerobic workout than anaerobic exercise. Salivary biomarkers such as lactate concentration, catalase activity, total protein concentration, calcium, potassium, magnesium ions, and the amide IV group may have a significant effect on the enhancement of light emission in a bioluminescent assay based on a system of coupled enzymatic reaction. The amide IV group and the presence of the salivary oligosaccharides, polysaccharides, phosphatase, and phospholipids in athletes during anaerobic physical activity can eliminate bioluminescence more efficiently than the concentration of triene conjugates and the amide II group in the saliva of athletes involved in aerobic exercises. Thus, significant biomarkers for the measurement of the physiological status of athletes who engaged in aerobic or anaerobic physical activity have been identified in saliva, these biomarkers can influence the integrated response of the bioluminescent enzymatic biotest. The change in the integrated bioluminescent indicator of athletes' saliva depending on the type of physical exertion can be used in sports medicine to prevent physical overload.

Keywords: bioluminescent enzymatic bioassay, biochemical analysis, infrared Fourier spectroscopy, saliva, aerobic and anaerobic exercise, sports medicine

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО БИОТЕСТА ДЛЯ АНАЛИЗА СЛЮНЫ РАБОТНИКОВ ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНОГО ТРАНСПОРТА С ЦЕЛЮ МОНИТОРИНГА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ ТРУДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2024 г. Л.В. Степанова*.,# , О.А. Коленчукова*., **, ***, Г.В. Жукова* ,
О.С. Сутормин*., ****, В.А. Кратасюк*., *****

*Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

**Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022, Россия

***Красноярский государственный аграрный университет, просп. Мира, 90, Красноярск, 660049, Россия

****Сургутский государственный университет, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, просп. Ленина, 1, Сургут, 628412, Россия

*****Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

#E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 09.05.2024 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

В качестве неинвазивного метода для мониторинга функционального состояния организма предложен биолюминесцентный ферментативный анализ слюны. Уровень интенсивности свечения би ферментной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой, при воздействии слюны, служил показателем состояния организма работников при трудовой нагрузке. Отсутствие достоверного различия между биолюминесцентным показателем до и после рабочей смены при неизменных биохимических и физико-химических параметрах слюны указывало на адаптацию организма к трудовой нагрузке. Повышенный биолюминесцентный показатель характерен для работников в состоянии хронического утомления, пониженный показатель – при наличии хронических заболеваний и вредных привычек. Выявлена зависимость биолюминесцентного показателя от концентрации лактата, продуктов перекисного окисления липидов, ионного и минерального состава, показателей свободнорадикального окисления и антирадикальной защиты. Таким образом, зависимость компонентного состава слюны от условий жизни и состояния здоровья работников определяет биолюминесцентный ферментативный биотест, пригодный для экспрессного мониторинга организма во время трудовой нагрузки.

Ключевые слова: биолюминесцентный ферментативный биотест, спектрофотометрический анализ, биохимический анализ, хемилюминесценция, слюна, работники железнодорожного транспорта, трудовая нагрузка, утомление, персонифицированная медицина.

DOI: 10.31857/S0006302924030224, EDN: ODFAQD

В современном мире, где технологический прогресс развивается стремительными темпами, трудовая деятельность человека все чаще связана с работой на транспорте. В частности, железнодорожный транспорт занимает особое место в обеспечении мобильности населения и грузоперевозок. Однако работа на железнодорожном транспорте сопряжена с высокими физическими и психологическими нагрузками, что может нега-

тивно сказаться на состоянии здоровья работников. В связи с этим актуальным является поиск эффективных методов мониторинга состояния здоровья работников железнодорожного транспорта [1].

Одним из перспективных направлений является анализ слюны человека, который обладает рядом преимуществ перед другими методами диагностики. Во-первых, слюна является доступ-

ным и неинвазивным биоматериалом, который можно получить в любое время без особых усилий [2–4]. Во-вторых, состав слюны изменяется в ответ на изменение состояния организма в большей степени, чем состав других биологических жидкостей [5–7]. Так, при стрессе содержание кортизола в слюне резко повышается [8], а содержание лактата – основного биомаркера функционального утомления организма – в слюне зависит от профессионального уровня работника [9].

В качестве перспективных решений для проведения долговременного мониторинга предлагаются портативные сенсоры, такие как каппы [10, 11], оптические и электрохимические биосенсоры [12], микрофлюидные чипы [9]. Несмотря на очевидные преимущества этих устройств, такие как простота использования, гибкость и возможность одноразового применения, существуют и ограничения, связанные с их недостаточной точностью и чувствительностью, сложностью дизайна и высокой стоимостью. Кроме того, для широкого применения таких устройств необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на подтверждение безопасности их использования в полости рта, не учитываются также индивидуальные различия слюны разных людей [13]. В связи с этим необходимо проведение исследований для определения исходного «контрольного уровня» и «уровня стресса» для каждого испытуемого, что позволит выявить контрольные и стрессовые точки для биомаркеров слюны.

Биоломинесцентная тест-система, состоящая из двух последовательных реакций, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой, была предложена для проведения экспрессного и точного анализа изменения состава биологических жидкостей, таких как слюна и кровь, под влиянием разного типа перегрузок, включая стрессовые. Этот биоломинесцентный анализ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, такими как иммуноферментный анализ (ELISA) и другие. В-первых, биоломинесцентный метод позволяет отслеживать изменения состава анализируемых жидкостей в режиме реального времени. Во-вторых, высокая чувствительность и специфичность такого анализа позволяет не только обнаруживать низкие концентрации анализируемых молекул, но и снизить затраты на оборудование и реагенты [14].

Ранее нами было показано, что биоломинесцентный анализ слюны позволяет установить стрессовое состояние организма при разном уровне психоэмоционального напряжения [15]. В настоящей работе предложено использовать биоломинесцентный ферментативный биотест для

оценки состояния утомления организма и адаптации его во время посменной обычной для организма трудовой нагрузки.

Таким образом, целью работы было выявление связи между показателями биоломинесцентного биотеста слюны, образа жизни испытуемых и факторами, влияющими на их организм при трудовой нагрузке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы специалисты оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги (филиала ОАО «РЖД») ($n = 19$) обоих полов в течение 5 недель (август–сентябрь 2022 г.) до и после дневной рабочей смены. Одна дневная рабочая смена состояла из 2 суток. Один рабочий день имел продолжительность 12 ч.

Было проведено анкетирование испытуемых о состоянии здоровья. Субъективная оценка здоровья содержала социально-демографические (возраст и пол) и профессиональные сведения, информацию об образе жизни и здоровье. Показатели здоровья и образа жизни включали вопросы о курении, употреблении кофейных напитков, оценку физической активности, принятия лекарственных средств, продолжительности сна, наличия и состава завтрака. Профессиональные вопросы включали данные о трудовом стаже, работе в должности, волнении на рабочем месте, субъективной оценке степени утомления организма после рабочей смены.

Заключения медицинских осмотров сотрудников были предоставлены ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» (Красноярск, Россия).

Материалом исследования служила биологическая жидкость – слюна. Нестимулированную слюну испытуемые отбирали самостоятельно путем сплевывания в стерильную пробирку объемом 2 мл до и после дневной рабочей смены.

Перед тестированием слюну центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Для тестирования использовали супернатант.

Нативную свежую слюну хранили в холодильнике при температуре 4°C в течение 4 ч и использовали для биоломинесцентного и хемилюминесцентного анализа. Замороженную слюну хранили в морозильной камере при температуре –18°C и использовали для спектрофотометрического и биохимического анализа.

Биоломинесцентное тестирование слюны проводили с использованием многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум» (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск, Россия). Каждый диск реагента содержал

ферменты: люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу из бактериальной культуры *Vibrio fischeri*, а также субстраты (тетрадеканаль (C_{14}) и никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), оба – Sigma, США), совместно иммобилизованные в высушенный крахмальный гель в виде дисков, содержащих реагенты для одного измерения [14]. Для иницирования реакции биолюминесценции вносили 0.5 мМ водный раствор флавиномононуклеотида (Serva, Германия).

Для хемилюминесцентного тестирования использовали люминол (AppliChem, Германия) и перекись водорода («Химпром», Россия).

Для спектрофотометрического тестирования использовали хлорид железа III (Solins, Россия)

Центрифугирование проводили на центрифуге Centrifuge 5810r (Eppendorf, Германия).

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония)

Биолюминесцентное тестирование проводили на кюветном люминометре Glomax 20/20 (Promega, США), хемилюминесцентное тестирование – на планшетном люминометре TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия).

Методика биолюминесцентного тестирования слюны включала в себя проведение контрольного и экспериментального измерения.

Реакционная смесь для измерения биолюминесценции содержала один диск реагента «Энзимолум», 300 мкл буфера, 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида.

Для проведения контрольного измерения в кювету последовательно вносили компоненты реакционной смеси и регистрировали максимальную интенсивность свечения. При экспериментальном тестировании 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны.

Измерения каждого образца слюны выполняли в трех повторностях. Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (интегральный биолюминесцентный показатель для слюны) как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (I) к контролю (I_0), умноженное на 100%:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\%.$$

Концентрацию лактата в образцах слюны определяли спектрофотометрическим методом с использованием хлорида железа III. Регистрировали оптическую плотность на длине волны 400 нм [16].

Биохимический, ионный и минеральный анализ слюны был выполнен сотрудниками Омского государственного педагогического университета под руководством Л.В. Бельской по стандартным методикам, адаптированным для слюны [17]. Определяли концентрацию общего белка, мочевины, глюкозы, содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, основание Шиффа), концентрацию ионов аммония, калия, магния, натрия, кальция, хлоридов, фосфатов, фторидов, нитратов, нитритов.

Антиоксидантный статус организма определяли H_2O_2 -люминол-зависимым хемилюминесцентным тестированием слюны по величине максимальной интенсивности свечения и площади под кривой хемилюминесценции [18].

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с использованием непараметрического критерия с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных интервалов (C_{25} и C_{75}). Кластерный анализ проведен методом K -средних, количество итераций – 10. Достоверность различий несвязанных параметров оценивали по критерию Манна–Уитни, связанных выборок – по критерию Вилкоксона. Корреляционный анализ данных проводили по критерию Спирмена для оценки существования возможных взаимозависимых связей между отдельными биомаркерами. Уровень значимости $p < 0.05$. На графиках указана высота столба – медиана (Me) (серединное значение выборки), края усов – межквартильный диапазон между 25-м процентилем (C_{25}) и 75-м процентилем (C_{75}), т.е. усы, отходящие вниз и вверх, обозначают минимальное и максимальное значения выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ персонифицированных анкет показал, что средний возраст мужчин и женщин составил 37 ± 13 лет (табл. 1). Состояние своего здоровья исследуемые работники оценивали на «хорошо». Большая часть работников не имела проблем со сном. Инсомнию имели молодые люди независимо от пола с трудовым стажем до 10 лет. Здоровый образ жизни без вредных привычек вели более 30% работников женского пола и 25% работников мужского пола. Большинство работников постоянно пили кофе или курили в течение рабочей смены. Большинство женщин, в отличие от мужчин, оценивали свое состояние на рабочем месте как «спокойное».

Трудовая нагрузка вызывала незначительную усталость для 26% работников (низкая степень), 30% указывали на утомление к концу дня (средняя степень) (работники 40–50 лет), 44% – силь-

Таблица 1. Социально-демографические характеристики и образ жизни исследуемых работников

№	Социально-демографический статус и образ жизни исследуемых работников		Показатели, %		
			общие (n = 19)	женщины (n = 11)	мужчины (n = 8)
1	Возраст	до 30 лет	21	36	12
		до 40 лет	42	27	63
		до 50 лет	32	27	25
		старше 50 лет	5	9	0
2	Трудовой стаж	до 10 лет	50	38	55
		от 10 лет	50	62	45
3	Работа в должности	1 год	5	9	0
		2 года	37	27	36
		4 года	58	64	64
4	Продолжительность сна и его состояние	6–8 часов спокойного сна	68	64	75
		3–4 часа беспокойного сна	32	36	25
5	Завтрак и его состав	отсутствует	42	27	63
		глутеновый	46	54	12
		белковый	12	19	25
6	Употребление кофе и курение	да	74	64	75
		нет	26	36	25
7	Физическая активность	отсутствует	100	100	100
8	Употребление лекарственных средств	присутствует	5	9	0
9	Волнение на рабочем месте	очень волнуются	5	9	0
		иногда волнуются	58	45	63
		спокойны	37	46	37
10	Степень утомления на рабочей смене	низкое	26	27	13
		среднее	30	22	37
		выше среднего	44	51	50

ное утомление в течение всего дня (высокая степень) (работники 30–40 лет).

Таким образом, исследуемые работники различались образом жизни и личностными характеристиками.

По результатам медицинских заключений исследуемые работники были распределены на группы по состоянию здоровья.

К первой группе были отнесены 32% исследуемых работников (n = 6), у которых отсутствовали хронические неинфекционные заболевания и факторы риска развития заболеваний. В первую группу вошли мужчины и женщины в возрасте более 45 лет, не имеющие вредных привычек и сопутствующих заболеваний. Степень утомления организма оценивали как «низкую».

Во вторую группу входили 21% исследуемых работников (n = 4), у которых не выявлены хронические неинфекционные заболевания, но имелись факторы риска развития заболеваний. Во вторую группу вошли женщины и мужчины в возрасте от 40 до 43 лет. Работники имели проблемы со зрением. Количество моноцитов и концентра-

ция холестерина в крови было выше нормы, что могло свидетельствовать о наличии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [19]. Степень утомления организма оценивали как «среднюю».

В третьей группе было 47% исследуемых работников (n = 9), которые имели хронические неинфекционные заболевания, им требовалось диспансерное наблюдение и высококвалифицированная медицинская помощь. В третью группу вошли женщины и мужчины в возрасте от 40 до 45 лет, имеющие вредные привычки, проблемы со зрением и сердечно-сосудистые заболевания. Содержание гемоглобина в крови было понижено. Биохимические показатели крови отличались от нормы по содержанию холестерина. Повышено количество лейкоцитов, лимфоцитов, эозинофилов в крови. Повышен показатель гематокрита. Представленный анализ крови свидетельствовал о наличии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и инфекционных патологий в хронической форме [19, 20]. Степень

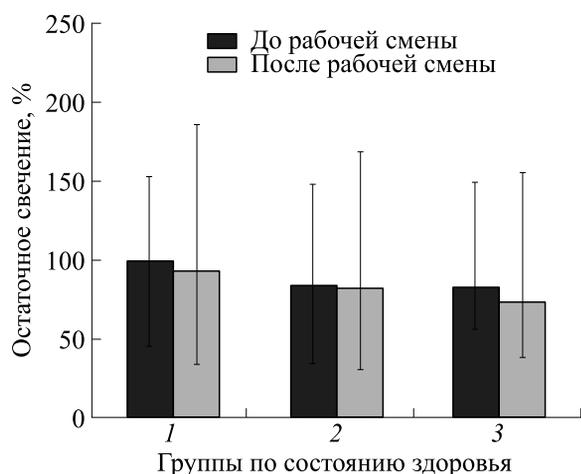


Рис. 1. Влияние слюны работников разных групп, отличающихся состоянием здоровья, на биолюминесцентный ферментативный биотест (первая группа – работники без хронических неинфекционных заболеваний и факторов риска развития заболеваний; вторая группа – работники без хронических неинфекционных заболеваний, но с факторами риска развития заболеваний; третья группа – работники, страдающие хроническими неинфекционными заболеваниями и требующие диспансерного наблюдения и высококвалифицированной медицинской помощи).

утомления организма оценивали как «выше среднего».

Биолюминесцентный анализ при воздействии слюны работников разных групп по состоянию здоровья показал, что уровень свечения для работников разных групп по состоянию здоровья достоверно не различался (рис. 1). Следовательно, биолюминесцентный биотест не позволил выявить различия между группами по состоянию здоровья.

Использование метода кластеризации по результатам биолюминесцентного тестирования слюны совместно с данными хемилюминесцентного и биохимического анализа слюны позволил выявить три кластера (рис. 2).

1-й кластер – самые высокие значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к первой и второй группе по состоянию здоровья (преимущественно первая группа) ($n = 5$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно выше результатов других кластеров ($p < 0.001$). Показатели до и после рабочей смены не различались.

2-й кластер – средние значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к первой и второй группе по состоянию здоровья (преимущественно вторая группа) ($n = 5$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно

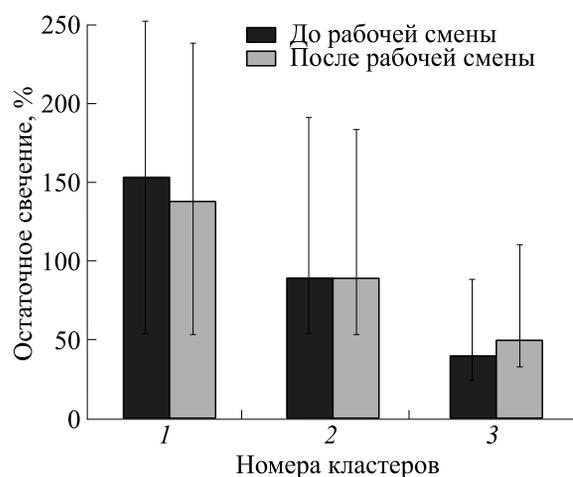


Рис. 2. Результаты кластеризации усредненных данных биолюминесцентного анализа слюны исследуемых работников (кластер 1 – работники первой и второй группы по состоянию здоровья (преимущественно первая группа), кластер 2 – работники первой и второй группы по состоянию здоровья (преимущественно вторая группа), кластер 3 – работники третьей группы по состоянию здоровья).

ниже результата 1-ого кластера ($p < 0.001$). До и после рабочей смены показатели не различались.

3-й кластер – самые низкие значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к третьей группе по состоянию здоровья ($n = 9$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно понижен по сравнению с результатами 1 и 2 кластеров ($p < 0.001$). До и после рабочей смены показатели не различались.

Полагаем, что наблюдаемая тенденция к понижению биолюминесцентного показателя от 1-го к 3-му кластеру связана с состоянием здоровья исследуемых работников. На степень тушения биолюминесцентного свечения могло влиять изменение биохимического состава слюны работников, вызванное заболеванием и наличием вредных привычек.

Отсутствие каких-либо видимых различий связано с тем, что усреднение показателей проводили в группах с большим разбросом индивидуальных характеристик.

Для выявления факторов, значимых для биолюминесцентного биотеста, был проведен анализ компонентного состава слюны до и после рабочей смены.

Выявлено, что компонентный состав слюны работников 2-ого кластера до рабочей смены был в пределах нормы по антиоксидантной активности, биохимическому, минеральному и ионному составу (табл. 2, кластер 2).

Таблица 2. Компонентный состав слюны работников, распределенных по разным кластерам до и после рабочей смены

Показатели слюны исследуемых работников		Кластер 1		Кластер 2		Кластер 3	
		до рабочей смены	после рабочей смены	до рабочей смены	после рабочей смены	до рабочей смены	после рабочей смены
Антиоксидантная активность слюны	Максимальная интенсивность хемилюминесценции, усл. ед.	3400.0 [1964.0–13010.0]	13645.0 [2035.8–18366.5] ($p_{12} = 0.003$)	5364.0 [1373.0–7899.0]	10296.0 [1193.0–14366.8]	887.1 [422.0–2130.5]	1179.3 [174.0–34235.5]
	Площадь под кривой хемилюминесценции, усл. ед.	390367.5 [283150.9–2051422.4]	731928.9 [229326.1–2582928.6] ($p_{12} = 0.003$)	839103.7 [175125.5–1207156.2]	736441.2 [206749.5–1813420.4]	83064.2 [79406.17–290028.7]	189755.6 [10949.5–2818288.4]
Органический состав слюны	Концентрация общего белка, г/л	0.6 [0.6–0.8]	0.6 [0.5–0.8]	0.6 [0.6–0.7]	0.7 [0.5–0.8]	0.7 [0.6–0.9]	0.9 [0.7–1.1] ($p_{56} = 0.03$)
	Концентрация мочевины, ммоль/л	0.3 [0.2–0.5]	0.3 [0.3–0.4]	0.4 [0.2–0.7]	0.4 [0.4–0.5]	0.3 [0.2–0.4]	0.5 [0.4–0.6] ($p_{56} = 0.007$)
	Активность каталазы, нкат/л	0.3 [0.2–0.3]	0.3 [0.3–0.4]	0.2 [0.2–0.3]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.2–0.3]	0.3 [0.2–0.3]
	Концентрация глюкозы, мкмоль/л	291.08 [82.0–291.1]	159.7 [159.7–161.0] ($p_{12} = 0.03$)	199.11 [189.2–203.4]	154.39 [102.5–294.5]	353.8 [82.3–416.5]	159.7 [159.7–240.7] ($p_{56} = 0.02$)
	Концентрация лактата, ммоль/л	3.9 [1.4–4.6]	1.9 [1.2–3.7]	3.1 [1.5–4.5]	2.5 [1.8–3.7]	2.9 [2.3–4.3]	3.2 [1.8–4.4] ($p_{46} = 0.01$) ($p_{26} = 0.005$)
Продукты перекисного окисления липидов	Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	0.2 [0.1–0.3]	0.6 [0.4–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.1 [0.09–0.10]	0.3 [0.2–0.3]	0.1 [0.1–0.4]	0.3 [0.2–0.5]
	Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	0.2 [0.2–0.3]	0.6 [0.4–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.2 [0.1–0.2]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.1–0.4]	0.3 [0.2–0.5]
	Концентрация оснований Шиффа, нмоль/мл	0.2 [0.1–0.5]	0.6 [0.5–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.1 [0.09–0.10]	0.3 [0.3–0.4]	0.3 [0.2–0.4]	0.4 [0.3–0.5] ($p_{56} = 0.003$)
Ионный состав слюны	Концентрация ионов аммония, ммоль/л	112.1 [112.1–144.0]	99.3 [84.4–124.2] ($p_{12} = 0.03$)	105.1 [99.8–107.2]	162.4 [155.7–174.1]	113.20 [109.9–139.0]	143.5 [126.3–181.7]
	Концентрация ионов калия, ммоль/л	555.7 [509.2–590.1]	371.2 [366.8–411.4] ($p_{12} = 0.03$)	490.8 [485.7–501.2]	549.5 [551.6–632.7]	609.9 [414.9–633.9]	719.6 [450.0–735.9]
	Концентрация ионов натрия, ммоль/л	83.6 [80.3–93.9]	112.08 [83.5–132.2]	80.8 [75.7–89.3]	114.97 [104.4–124.4]	92.47 [73.2–135.6]	91.77 [80.8–112.2]
	Концентрация ионов магния, ммоль/л	1.8 [1.6–2.4]	2.8 [2.6–2.9]	2.6 [1.9–3.2]	2.3 [1.1–2.5]	2.5 [1.6–3.5]	3.2 [2.6–3.5]
	Концентрация ионов кальция, ммоль/л	22.2 [19.4–22.2]	64.9 [48.9–71.7]	37.8 [31.8–42.4]	31.3 [20.5–41.2]	22.2 [19.1–39.8]	30.5 [27.1–34.8]
Минеральный состав слюны	Концентрация хлоридов, ммоль/л	448.8 [448.8–494.1]	466.5 [463.2–501.0]	397.4 [387.1–414.2]	456.1 [441.8–508.4]	516.5 [417.0–547.8]	518.5 [469.8–530.4]
	Концентрация нитритов, ммоль/л	3.2 [2.2–4.7]	5.0 [5.0–5.6]	2.4 [2.1–3.4]	4.7 [4.4–5.8]	3.2 [1.2–3.5]	5.0 [4.9–5.0]
	Концентрация сульфатов, ммоль/л	13.7 [10.3–43.2]	59.8 [59.8–85.7] ($p_{12} = 0.03$)	16.9 [14.9–17.5]	41.1 [35.7–42.1]	22.6 [21.5–34.8]	22.1 [18.6–58.4]
	Концентрация нитратов, ммоль/л	6.2 [5.1–7.8]	5.8 [4.0–6.8]	5.4 [4.8–6.1]	4.1 [3.5–4.2]	5.5 [5.0–5.8]	3.5 [2.3–4.8]
	Концентрация фторидов, ммоль/л	2.81 [2.6–4.7]	9.5 [9.5–15.4]	90.2 [89.4–101.0]	8.9 [8.3–9.8]	4.76 [4.1–6.5]	6.8 [5.0–9.5]
	Концентрация фосфатов, ммоль/л	256.3 [256.3–282.3]	335.6 [327.3–360.0]	273.4 [271.2–284.7]	291.5 [285.7–301.4]	339.7 [285.8–387.4]	408.4 [374.6–565.8] ($p_{56} = 0.02$)

Примечание. Данные представлены в виде $Me [C25–C75]$.

Выявлена корреляционная связь биоломинесцентного показателя до рабочей смены с возрастом исследуемых работников ($r = 0.2, p = 0.04$) и концентрацией глюкозы в слюне ($r = -0.4, p = 0.03$), что может быть связано с влиянием углеводсодержащих продуктов «легкого питания» [20].

После рабочей смены показатели слюны существенно не изменялись. Определена корреляционная взаимосвязь биоломинесцентного показателя с уровнем утомления ($r = -0.2, p = 0.03$) и с концентрацией ионов кальция ($r = 0.4, p = 0.04$) для работников с сердечно-сосудистым заболеванием [19, 21] и с минеральным составом слюны (концентрацией фторидов и фосфатов) ($r = 0.5, p = 0.04$) для работников с заболеванием почек [22, 23].

Полагаем, что работники 2-го кластера испытывали адаптационный стресс, связанный с усталостью после трудовой нагрузки.

Слюна работников 1-го кластера усиливала биоломинесцентное свечение, при этом выявлены существенные отличия компонентного состава слюны до и после рабочей смены. Достоверно повышена антиоксидантная активность ферментов ($p = 0.003$), накапливались продукты перекисного окисления липидов – маркеры окислительного стресса (диеновые и триеновые конъюгаты, основания Шиффа) ($p < 0.001$), повышена концентрация глюкозы в слюне ($p = 0.03$), концентрации ионов аммония, калия ($p = 0.03$) и сульфатов ($p = 0.03$) (табл. 2, кластер 2). Полученные данные указывают на присутствие окислительного стресса, а также ожирения [24].

Выявлена корреляционная взаимосвязь биоломинесцентного показателя до рабочей смены с уровнем утомления ($r = -0.3, p = 0.04$) и концентрацией лактата в слюне ($r = -0.2, p = 0.04$), что может быть связано с наличием хронического утомления в организме [25, 26]. Корреляционная взаимосвязь биоломинесцентного показателя с показателями компонентного состава слюны после рабочей смены отсутствовала.

Основная часть исследуемых работников 3-го кластера имели вредные привычки и хронические заболевания. Слюна исследуемых работников, взятая до рабочей смены, сильнее ингибировала биоломинесцентное свечение по сравнению с результатами, полученными после рабочей смены, вследствие различия компонентного состава слюны.

Трудовая нагрузка достоверно повышала концентрацию общего белка ($p = 0.03$), мочевины ($p = 0.007$) и глюкозы ($p = 0.02$), продуктов пере-

кисного окисления липидов (основания Шиффа) ($p = 0.003$), а также концентрацию фосфатов ($p = 0.02$) (табл. 2, кластер 3), что подтверждало наличие хронических заболеваний и воспалительных процессов, сопровождающихся активацией иммунной системы [27]. Концентрация лактата в слюне после рабочей смены достоверно повышена по сравнению с показателями работников 1-го и 2-го кластера, что указывало на хроническое утомление [25, 26].

Выявлена корреляционная взаимосвязь биоломинесцентного показателя до рабочей смены с концентрацией общего белка ($r = 0.5, p = 0.03$), продуктами перекисного окисления липидов (триеновые конъюгаты, основания Шиффа) ($r = 0.5, p = 0.05$), концентрацией ионов калия, натрия, кальция ($r = 0.5, p = 0.04$) и содержанием хлоридов ($r = 0.6, p = 0.04$), что свидетельствовало о стрессовом состоянии организма, вызванного хроническими заболеваниями и наличием вредных привычек [24, 27]. Корреляционная взаимосвязь биоломинесцентного показателя с показателями компонентного состава слюны после рабочей смены отсутствовала.

Следовательно, низкий показатель биоломинесценции работников 3-го кластера во взаимосвязи с биомаркерами хронических заболеваний и воспалительных процессов указывал на состояние хронического утомления до рабочей смены и перегрузки организма после трудового дня, поэтому работников 3-го кластера можно отнести к группе риска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исходя из полученных результатов следует, что неинвазивный интегральный биоломинесцентный анализ слюны на основе иммобилизованной биферментной системы «НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцефераза» может быть использован для выявления утомления работников во время трудовой нагрузки в посменной работе для контроля перегрузок, которые впоследствии могут существенно ухудшить трудоспособность работника.

Отсутствие изменений биоломинесцентного показателя при воздействии слюны, отобранной до и после рабочей смены, может указывать на адаптационное состояние организма работника при трудовой нагрузке в посменной работе. При этом компонентный состав слюны исследуемых работников может изменяться в пределах индивидуальной нормы.

Изменение активности биферментной системы под воздействием слюны может указывать на

степень утомления организма во время трудовой нагрузки. Изменение компонентного состава слюны обусловлено накоплением продуктов перекисного окисления липидов при повышенной антиоксидантной активности, повышенным содержанием органических веществ, при воспалительных процессах в организме, изменении ионного и минерального состава при хронических заболеваниях и наличии вредных привычек.

Определение контрольного диапазона для биолюминесцентного показателя при воздействии слюны дает возможность выявить факторы, вызывающие стресс и хроническое утомление для каждого сотрудника, и создать условия, снижающие стрессовую нагрузку (временные интервалы для отдыха во время смены, диспансерное наблюдение и т.п.).

Неинвазивный интегральный биолюминесцентный анализ слюны может быть использован для выявления группы риска работников, у которых обнаружено понижение биолюминесцентного показателя во время трудовой смены. Это является сигналом неблагополучного состояния организма (воспалительные заболевания, нарушение режима дня и питания, стрессовые эмоциональные или физические перегрузки во внерабочее время и т.п.).

Применение биолюминесцентного тестирования для контроля над функциональным состоянием организма работников ОАО «РЖД» будет способствовать повышению качества и эффективности работы на железнодорожном транспорте, обеспечивать безопасность движения поездов, снижение производственного травматизма и профессиональной заболеваемости, позволит рационально использовать трудовые ресурсы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Красноярской железной дороги (филиала ОАО «РЖД»), за оказанную помощь в проведении исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-10039, <https://rscf.ru/project/23-25-10039>) совместно с Красноярским краевым фондом науки (Красноярский край) (проект «Биологические маркеры профессионального здоровья и долголетия работников в сфере железнодорожного транспорта»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья испытуемых в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, и одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (протокол № 11 от 10.10.2023 года). Испытуемые подписывали информированное добровольное согласие на участие в эксперименте и обработку данных после получения разъяснений о характере предстоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klaassens E. R., Giltay E. J., van Veen T., Veen G., and Zitman F. G. Trauma exposure in relation to basal salivary cortisol and the hormone response to the dexamethasone/CRH test in male railway employees without lifetime psychopathology. *Psychoneuroendocrinology*, **35** (6), 878–886 (2010). DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.11.012
2. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. *Биохимические методы исследования слюны в лабораторной диагностике* (ИНТЕХ, Омск, 2013).
3. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., and Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Arch. Oral Biol.*, **57** (5), 556–566 (2012). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.016
4. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. Околосуточная динамика состава слюны человека по данным ИК-Фурье-спектроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*, **63** (5), 277–281 (2018). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-277-281
5. Bel'skaya L. V. Application of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Bull. Sci. & Practice*, **2** (15), 132–140 (2017). DOI: 10.5281/zenodo.291849
6. Бельская Л. В., Голованова О. А., Шукайло Е. С. и Турманидзе В. Г. Экспериментальное исследование кристаллизации биологических жидкостей. *Вестн. Отделения наук о Земле РАН*, **3**, NZ6012 (2011). DOI: 10.2205/2011NZ000142
7. Турлак И. В. Слюна – основные направления исследования ее свойств. *Современные проблемы науки и образования*, **4**, (2020). <https://s.science-education.ru/pdf/2020/4/29934.pdf> (ссылка активна на 02.05.2024).
8. de Kloet C. S., Vermetten E., Heijnen C. J., Geuze E., Lentjes E. G., and Westenberg H. G. Enhanced cortisol suppression in response to dexamethasone administra-

- tion in traumatized veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, **32** (3), 215–226 (2007). DOI: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.009
9. Yao Y., Li H., Wang D., Liu C., and Zhang C. An electrochemiluminescence cloth-based biosensor with smartphone-based imaging for detection of lactate in saliva. *Analyst*, **142** (19), 3715–3724 (2017). DOI: 10.1039/C7AN01008G
 10. Bellagambi F. G., Baraket A., Longo A., Vatteroni M., Zine N., Bausells J., Fuoco R., Francesco F. D., Salvo P., Karanasiou G. S., Fotiadis D. I., Mencias A., and Errachid A. Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **251**, 1026–1033 (2017). DOI: 10.1016/j.snb.2017.05.169
 11. Soni A., Surana R. K., and Jha S. K. Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **269**, 346–353 (2018). DOI: 10.1016/j.snb.2018.04.108 0925-4005
 12. Shi W., Li J., Wu J., Wei Q., Chen C. Bao N., Yu C., and Gu H. An electrochemical biosensor based on multi-wall carbon nanotube–modified screen-printed electrode immobilized by uricase for the detection of salivary uric acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412** (26), 7275–7283 (2020). DOI: 10.1007/s00216-020-02860-w
 13. Ilea A., Andrei V., Feurdean C. N., Băbțan A. M., Petrescu N. B., Cămpian R. S., Boșca A. B., Ciui B., Terțiș M., Săndulescu R., and Cristea C. Saliva, a magic biofluid available for multilevel assessment and a mirror of general health – A systematic review. *Biosensors (Basel)*, **9** (1) 27 (2019). DOI: 10.3390/bios9010027
 14. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Springer, Berlin, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
 15. Zhukova G. V., Kolenchukova O. A., Ryzhikova E. M., Stepanova L. V., and Kratasyuk V. A. Comprehensive assessment of the health of young people living in the Far North. *Sib. J. Life Sci. & Agriculture*, **14** (5), 226–245 (2022). DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-5-226-245
 16. Borshchevskaya L. N., Gordeeva T. L., Kalinina A. N., and Sineokii S. P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *J. Anal. Chem.*, **71** (8), 755–758 (2016). DOI: 10.1134/S1061934816080037
 17. Bel'skaya L. V., Kosenok V. K., and Massard G. Endogenous intoxication and saliva lipid peroxidation in patients with lung cancer. *Diagnostics*, **6** (4), 39 (2016). DOI: 10.3390/diagnostics6040039
 18. Винник Ю. С., Савченко А. А., Перьянова О. В., Теплякова О. В., Якимов С. В., Тепляков Е. Ю. и Мешкова О. С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа. *Сиб. мед. обозрение*, **40** (3), 3–6 (2006).
 19. Chen J., Wu K., Cao W., Shao J., and Huang M. Association between monocyte to high-density lipoprotein cholesterol ratio and multi-vessel coronary artery disease: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.*, **22**, 121 (2023). DOI: 10.1186/s12944-023-01897-x
 20. Мандра Ю. В., Каминская Л. А., Светлакова Е. Н., Гаврилов И. В., Жолондзиовский П. А. и Тимербулатов А. Д. Динамика изменения биохимического состава слюны под влиянием углеводсодержащих продуктов «Легкого питания». *Проблемы стоматологии*, **4**, 10–16 (2016).
 21. Доценко М., Алексейчик Д., Панкратова Ю., Алексейчик С., Доценко К. и Санкович Е. Холестерин и иммунитет: клинико-иммунологические параллели. *Наука и инновации*, **4** (146), 58–64 (2015).
 22. Чемикосова Т. С. и Гуляева О. А. Отклонения в минеральном составе ротовой жидкости у рабочих производства хлорфеноксигербицидов. *Проблемы стоматологии*, **2**, 3–7 (2005).
 23. Мартынов С. А. и Шамхалова М. Ш. Гиперфосфатемия при хронической болезни почек. *Медицинский совет*, **16**, 72–78 (2019). DOI: 10.21518/2079-701X-2019-16-78-85
 24. Cichońska D., Kusiak A., Kochańska B., Ochocińska J., and Świetlik D. Influence of electronic cigarettes on selected physicochemical properties of saliva. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **19** (6), 3314 (2022). DOI: 10.3390/ijerph19063314
 25. Franco-Martínez L., Tvarijonaviciute A., Martínez-Subiela S., Márquez G., Martínez Díaz N., Cugat R., Cerón J. J., and Jiménez-Reyes P. Changes in lactate, ferritin, and uric acid in saliva after repeated explosive effort sequences. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **59** (6), 902–909 (2019). DOI: 10.23736/S0022-4707.18.08792-3
 26. Shungu D. C., Weiduschat N., Murrugh J. W., Mao X., Pillemer S., Dyke J. P., Medow M. S., Natelson B. H., Stewart J. M., and Mathew S. J. Increased ventricular lactate in chronic fatigue syndrome. III. Relationships to cortical glutathione and clinical symptoms implicate oxidative stress in disorder pathophysiology. *NMR Biomed.*, **25** (9), 1073–1087 (2012). DOI: 10.1002/nbm.2772
 27. Голубева В. Л., Белова В. В., Адеишвили Т. Ш., Белачеу И. А., Юрина Т. М. и Елифанова Н. Ю. Изменения белков крови в диагностике заболеваний пациентов разных возрастных групп. *Актуальные проблемы медицины*, **22** (117), 5–9 (2011).

The Use of the Bioluminescent Enzyme Bioassay for the Analysis of Saliva of Railway Transport Workers to Monitor the Functional State of the Body in the Conditions of Labor Activity

L.V. Stepanova*, O.A. Kolenchukova*, **, ***, G.V. Zhukova*,
O.S. Sutormin*, ****, and V.A. Kratasyuk*, *****

*Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Partizana Zheleznyaka 3g, Krasnoyarsk, 660022 Russia

***Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia

****Surgut State University, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra, prosp. Lenina 1, Surgut, 628412 Russia

*****Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

This paper proposes bioluminescent enzymatic assay of saliva as a non-invasive method for monitoring the functional state of the body. The value of luminescence intensity from coupled enzyme-based reaction catalyzed by NADH:FMN oxidoreductase and luciferase, when exposed to saliva, served as an indicator of the state of the body of workers at work. The absence of a significant difference between profiles of bioluminescence before and after the shift and no changes in biochemical, physical and chemical parameters of saliva indicated that the bodies had adapted to a workload. An increased bioluminescent intensity value is typical for workers in a state of chronic fatigue, a decreased one points to the presence of chronic diseases and bad habits. The dependence of the bioluminescent intensity value on the concentration of lactate, lipid peroxidation products, ionic and mineral composition, the values of free radical oxidation and antiradical protection was identified. Thus, the dependence of the saliva constituents on conditions of life and health status of workers can be identified using bioluminescent enzyme bioassay that is suitable for rapid monitoring of the body at work.

Keywords: bioluminescent enzyme bioassay, spectrophotometric analysis, biochemical analysis, chemiluminescence, saliva, railway transport workers, workload, fatigue, personalized medicine

УДК 577.34

ФОТОБИОЛОГИЯ В РОССИИ

© 2024 г. А.А. Цыганков*, М.М. Борисова-Мубаракшина*, Е.С. Высоцкий**,
А.Е. Соловченко***, Н.В. Суворов****, В.В. Тучин*****

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение
ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

**Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

***Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

****МИРЭА – Российский технологический университет, просп. Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

*****Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Астраханская ул., 83, Саратов, 410012, Россия

*****Национальный исследовательский Томский государственный университет,
просп. Ленина, 36, Томск, 634050, Россия

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

После доработки 17.05.2024 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

Фотобиология – это динамично развивающаяся область знаний и практической деятельности. Российское фотобиологическое общество содействует развитию творческой деятельности и коммуникации ученых и практиков в области фотобиологии и смежных дисциплин. В сентябре 2023 г. состоялся X Съезд Российского фотобиологического общества с конференцией «Современные проблемы фотобиологии». В статье приводятся определения фотобиологии, биофотоники, фотобиотехнологии, биолюминесценции. Описана краткая история Российского фотобиологического общества, а также обзор программы и результатов X съезда и конференции, включая резюме статей, подготовленных по материалам докладов на съезде, наиболее близких по своей тематике к биофизике.

Ключевые слова: фотобиология, биофотоника, фотобиотехнология, Российское фотобиологическое общество, съезд Российского фотобиологического общества.

DOI: 10.31857/S0006302924030234, EDN: ODEROF

Для понимания читателем, чем же занимаются фотобиологи, необходимо дать определение предмета их исследований. **Фотобиология – это область знаний и практической деятельности, изучающая излучение и поглощение биологическими системами неионизирующей радиации и разрабатывающая способы их применения.** Другими словами, фотобиология – это и дисциплина (для студентов и преподавателей), и междисциплинарное научное направление (для ученых), и межведомственная отрасль промышленности. Российское фотобиологическое общество (РФО), являясь некоммерческой организацией без образования юридического лица, объединяет всех, кому интересно взаимодействие света и биологических систем самого разного уровня организации с самых разных точек зрения. Основной целью РФО является содействие развитию творческой деятельности ученых, инженерно-технических работников, преподавателей, учащихся и других заинтересованных лиц в области фотобио-

логии и сопредельных научных дисциплин, а также распространение среди научной общественности информации о работах, посвященных фотобиологии и проводимых в России.

Российское фотобиологическое общество было организовано в г. Пушкино (Московская область) в феврале 1992 года. Первым президентом РФО был избран профессор Валентин Ильич Кефели – директор Института почвоведения и фотосинтеза Пушкинского научного центра АН СССР. К тому времени, начиная с 1967 года, на базе Института почвоведения и фотосинтеза уже регулярно проходили Пушкинские чтения по фотосинтезу, инициированные научным советом по фотосинтезу АН СССР. Пушкинские чтения были направлены на ознакомление с современным состоянием исследований фотосинтеза и применяемыми в них методами. Однако стремительное развитие биологической науки по таким межотраслевым областям, как фоторецепция, экологическая фотобиология, биофотоника, фотомедицина и др. привело к необходимости организации мероприятий с более широким охватом

Сокращения: ФСII – фотосистема II, ФСI – фотосистема I.

процессов взаимодействия света с биологическими системами и, более того, к созданию нового научного общества – РФО.

К настоящему времени было организовано и успешно проведено 10 съездов РФО [1, 2]). Первый съезд РФО был проведен в Пушкино в 1996 г., на нем новым президентом РФО был избран академик Владимир Анатольевич Шувалов – новый директор Института почвоведения и фотосинтеза. На съезде впервые обсуждались не только вопросы биохимии и биофизики фотосинтеза, фоторецепции и регуляции фотосинтеза, но и вопросы фотодинамической терапии. На втором съезде РФО, проведенном также в Пушкино в 1998 г., президентом РФО был избран профессор Александр Александрович Красновский (мл.) (Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва). Третий съезд РФО был организован в Воронеже на базе Воронежского государственного университета в 2001 г., впервые в рамках этого мероприятия была проведена первая школа для молодых ученых.

Четвертый съезд РФО, организованный Институтом оптики и биофотоники Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского в 2005 г., стал событием международного значения. Помимо 200 участников самого съезда, участниками международной школы, проведенной в его рамках для молодых ученых, стали более 500 молодых ученых из разных стран мира, таких как Армения, Беларусь, Израиль, Канада, Финляндия, Франция, Украина и США. Новым президентом был избран профессор Алексей Юрьевич Семенов (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского при МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва).

Пятый съезд РФО прошел с нововведениями, одним из которых стала международная конференция «Преобразование световой энергии в процессе фотосинтеза». Это привело к расширению охвата научных направлений и разнообразия секций. Съезд с конференцией состоялся в 2008 г. на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН в Пушкино. В мероприятии участвовали не только российские ученые, но и ученые из Беларуси, Германии, Швеции, Украины и США.

Начиная с шестого съезда РФО в 2011 г. местом проведения съезда с сопутствующей конференцией стал пансионат «Маяк» в поселке Шепси Краснодарского края, расположенный на побережье Черного моря.

На седьмом съезде РФО был избран новый президент общества – Анатолий Анатольевич Цыганков (Институт фундаментальных проблем биологии РАН – в настоящее время обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино). Под его руководством были организованы и успешно проведены восьмой, девятый и десятый съезды РФО с конференцией «Современные проблемы фотобиологии». В этот период программа конференции по-

полнилась новыми секциями, посвященными водородной энергетике, биотопливу и экологической фотобиологии.

В настоящее время в РФО функционируют 7 региональных отделений:

– Московское отделение, председатель д.б.н. Алексей Юрьевич Семенов;

– Московское областное отделение (на базе Пушкино), председатель д.б.н. Анатолий Анатольевич Цыганков;

– Санкт-Петербургское отделение, председатель – к.б.н. Ольга Владимировна Войцеховская;

– Воронежское отделение, председатель – д.б.н., профессор Валерий Григорьевич Артюхов;

– Красноярское отделение, председатель – к.б.н. Евгений Степанович Высоккий;

– Нижегородское отделение, председатель – к.б.н. Владимир Сергеевич Сухов;

– Саратовское отделение, председатель чл.-корр. РАН Валерий Викторович Тучин.

Помимо организации съездов, РФО принимает активное участие в других, не менее значимых, мероприятиях, включая международные конференции и семинары. Так, в 2013 г. в Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН состоялась Международная конференция «Фотобиохимия: Проблемы и перспективы», посвященная 100-летию со дня рождения академика А.А. Красновского. Кроме того, с участием РФО в 2006 г. была организована Международная конференция «Фотосинтез в постгеномную эру: Структура и функция фотосистем» (Пушкино), в 2015 г. – Международная конференция «Первичный перенос электронов в фотосинтетических реакционных центрах» (Псков), в 2019 г. – международная конференция «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019» in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum (Санкт-Петербург) [3]. Отдельно стоит отметить организацию Саратовским региональным отделением ежегодной международной конференции “Saratov Fall Meeting” (<https://sfmconference.org>). Она включает международную школу для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофотонике, а также научный симпозиум по оптике и биофотонике, российско-китайский научный семинар по биофотонике и биомедицинской оптике и научный семинар стран БРИКС по биофотонике; в 2023 г. была приведена 27-я по счету конференция.

Также стоит выделить кооперацию РФО с Европейским фотобиологическим обществом (ESP). В декабре 2021 г. под патронажем ESP и РФО прошла онлайн-конференция “Green Christmas Session” на тему “Photosynthetic microorganisms for sustainability”. Виртуальным организатором конференции выступил Институт биологических систем (Institute for Biological Systems of the National Research Council (ICB-CNR), Montelibretti, Италия). Председателем конференции была д.б.н. Майя Димова Ламбрева

(Lambrea Maya Dimova, ISB-CNR), сопредседателем — действующий на тот период вице-президент РФО, д.б.н. Мария Мансуровна Борисова. С основными докладами выступили президент ESP профессор Массимо Тротта и профессор МГУ имени М.В. Ломоносова Алексей Евгеньевич Соловченко, ведущий российский специалист в области биотехнологии микроводорослей.

С 10 по 17 сентября 2023 года состоялись десятый съезд РФО и конференция «Современные проблемы фотобиологии», которым посвящен настоящий специальный выпуск журнала «Биофизика». Конференция прошла с насыщенной научной программой. Работа съезда была посвящена подведению итогов деятельности прежнего и выборам нового центрального совета общества, включая его президента и вице-президентов. Традиционно организаторами мероприятия выступили Институт фундаментальных проблем биологии РАН и Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. На X съезде РФО был избран президент РФО — д.б.н. Мария Мансуровна Борисова, представившая свое видение развития РФО. Нововведением стало предложение о проведении региональных собраний РФО — мероприятий, организуемых региональными отделениями РФО.

Научная программа конференции была разделена на восемь секций:

1. Первичные процессы фотосинтеза;
2. Регуляция фотосинтеза;
3. Фоторецепция;
4. Фундаментальные основы фотодинамической и лазерной терапии;
5. Биофотоника молекул, наночастиц, клеток и тканей;
6. Биолюминесценция и фотоника флуоресцентных белков;
7. Фотосинтезирующие организмы как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты;
8. Экологическая фотобиология.

Всего в съезде участвовало около 450 авторов со 135 докладами. Первая секция в данном выпуске журнала «Биофизика» представлена четырьмя статьями из числа 2 пленарных, 7 устных и 5 стендовых докладов, зачитанных на съезде. В работе Дегтерева с соавт. [4] предложен комплексный подход к оценке гетерогенности фотосистемы II (ФСII), основанный на математическом анализе формы кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*. С использованием данных, полученных на ряде культур микроводорослей, проведена оценка соотношения реакционных центров с различным размером антенн (альфа- и бета-центров), а также определена доля активных и неактивных кислород-выделяющих комплексов. Пашенко с соавт. [5] представили результаты исследования влияния катионных антисептиков на изолированные из шпината и цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 коровые

комплексы ФСII и цианобактериальные комплексы фотосистемы I (ФСI). Показано, что наибольший эффект из изученных антисептиков оказывал октенидин, и предложен механизм его действия. Петрова с соавт. [6] представили обзор последних результатов изучения фотохимического преобразования энергии в реакционных центрах ФСI из *Acarochloris marina*, цианобактерии, у которой в ФСI находится преимущественно Хл *d*, вследствие чего спектр поглощения сдвинут в красную область на 40 нм. Рассмотрены описанные в литературе возможные механизмы компенсации энергетических потерь при использовании для фотосинтеза низкоэнергетического дальнего красного света. В обзоре Золина с соавт. [7] представлены современные представления о механизмах формирования изменений фотохимического индекса отражения в различных временных диапазонах и дана оценка перспектив использования фотохимического индекса отражения в качестве инструмента для дистанционного и проксимального мониторинга быстрых изменений состояния растений в неблагоприятных условиях.

Вторая секция представлена тремя статьями, причем на съезде было 3 пленарных, 13 устных и 13 стендовых докладов. В обзоре Ветошкиной с соавт. [8] показана важная роль пластохинона у растений в качестве антиоксиданта. Наряду с оценкой литературных данных о взаимодействии пластохинона с активными формами кислорода, выявлен факт, что в стрессовых условиях синтез пластохинона возрастает. Отдельная глава посвящена методам создания растений с повышенным содержанием пластохинона, в ней обсуждаются возможности практического применения растительного пластохинона для защиты мембранных структур от окисления. Иванов и Руденко [9] представили обзор о роли карбоангидраз хлоропластов высших С3-растений в адаптационных изменениях фотосинтетических реакций. Предложены возможные механизмы участия карбоангидраз в протекании светозависимых процессов в хлоропласте. На основании полученных результатов высказана гипотеза о взаимосвязанном функционировании карбоангидраз в хлоропластах. Попова с соавт. [10] представили результаты изучения влияния комбинации локальных факторов на показатели водного обмена при поливе и засухе. Было показано, что модифицированный индекс проводимости устьиц, измеренный тепловым зондом, снижался при засухе и корнелировал с водным статусом растения. Локальное действие только нагрева или только освещения не вызывало изменений этого индекса. Результаты показывают, что локальное действие комбинации нагрева и освещения вызывает стрессовые сигналы, снижающие водный обмен пшеницы.

Третья секция не представлена статьями в данном выпуске, но она включала 1 пленарный, 5 устных и 4 стендовых доклада.

Четвертая секция представлена двумя статьями, на съезде было 2 пленарных, 13 устных и 3 стендовых доклада. В работе Ноева с соавт. [11] описаны свойства вновь синтезированных управляемых светом блокаторов потенциал-зависимых натриевых каналов на основе азобензола и исследованы их местноанестетические и аритмические свойства. Обнаруженная эффективная светозависимая биологическая активность этеркаина и его производных позволяет рассматривать полученные соединения как потенциальные инструменты для управляемой светом местной анестезии, а также для неинвазивной абляции очагов аритмии в кардиологии. Бучарская с соавт. [12] продемонстрировали высокую эффективность комбинированной фотодинамической и плазмонной фототермической терапии в модели крыс с перевитыми опухолями. Через 21 сутки после такого воздействия отмечали значительное торможение роста опухолей.

Поскольку секция 5 и частично секция 6 связаны с биофотоникой (см. выше), введем определение биофотоники, которое поддерживают все авторы данной статьи. Данное определение в значительной степени основывается на определении фотоники, данном президентом Лазерной ассоциации И.Б. Ковшом [13]. **Биофотоника – это область знаний и практической деятельности, изучающая взаимодействие биологических систем со светом, излучаемым источниками, построенными на новых принципах, а также возможности использования таких источников в науках о жизни и медицине.** Другая часть сообщений, представленных на секции 6, касалась исследований биолюминесценции различных организмов и аналитических применений этого явления для нужд медицины, биотехнологии и экологии. **Биолюминесценция – это излучение света видимого спектрального диапазона живыми организмами, возникающее в результате ферментативного окисления специфического низкомолекулярного субстрата.** Это явление широко представлено в природе. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнорастворимых, червей, моллюсков, насекомых и рыб. В настоящее время насчитывается несколько тысяч биолюминесцентных видов среди представителей более чем 700 родов.

Секции 5 и 6 представлены в данном сборнике девятью статьями, причем на съезде суммарно на этих секциях было 8 пленарных, 28 устных и 8 стендовых докладов. Пузырь с соавт. [14] выявили такие уникальные особенности люминесцентного гриба *Mycena gombakensis*, как стабильность при хранении в нестерильных условиях и способность передавать воздействие ультрафиолетового излучения вглубь мицелия. Полученные данные свидетельствуют о перспективности его использования в биотехнологии и в исследованиях биофизики сложной системы базидиомицетов. Ломакина с соавт. [15] описали тест-систему на основе живых клеток *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующих рН-резистентную термостабильную люциферазу светля-

ка *Luciola mingrelica*. С ее использованием изучена кинетика действия аминокликозидов по изменению содержания АТФ и люциферазы внутри и вне клеток. Метод перспективен при проведении быстрого первичного высокопроизводительного скрининга антибактериальных агентов и лекарственных форм. Ронжин с соавт. [16] сообщили, что добавки кофейной кислоты и обнаруженного авторами низкомолекулярного стимулятора биолюминесценции к мицелию светящегося гриба *Neonothopanus nambi* приводят к быстрому и значительному (на порядок и более) увеличению интенсивности его световой эмиссии. При этом установлено, что кофейная кислота и обнаруженный низкомолекулярный стимулятор свечения не влияют на уровень световой эмиссии люминесцентной системы *N. nambi* в присутствии НАДФН и существенным образом подавляют реакцию излучения системы, активированной НАДФН и гиспидином. Авторы считают, что в светящихся высших грибах возможно наличие разных биохимических путей генерации квантов видимого света с участием разных ферментов (или ферментных систем) и субстратов. Малышева с соавт. [17] выявляли в слюне биомаркеры физиологического состояния организма у спортсменов с анаэробной или аэробной физической нагрузкой, способные оказывать влияние на интегральный ответ бактериальной ферментативной биолюминесцентной тест-системы. Показано, что на усиление светоизлучения в биолюминесцентной биферментной реакции способны оказывать влияние такие биомаркеры слюны, как концентрация лактата и общего белка, активность каталазы, концентрация ионов кальция, калия, магния и содержание амидов группы IV. Степанова с соавт. [18] предложили использовать биолюминесцентный ферментативный биотест в качестве интегрального показателя состояния организма на примере работников ОАО «Российские железные дороги». Показано, что этот тест индивидуален, и его можно использовать только при сравнении показателей конкретного работника в норме и при стрессе. При этом условия биолюминесцентный тест можно использовать для экспресс-мониторинга состояния организма работника во время трудовой нагрузки, что важно для организации условий труда работников ОАО «РЖД», исключая аварийные ситуации. Лисица с соавт. [19] определяли относительный квантовый выход биолюминесценции люциферазной реакции в расчете на молекулу субстрата. Обнаружено, что в вязких средах с добавлением глицерина или сахарозы квантовый выход люминесценции возрастал. Анализ конформации боковой цепи alphaHis44 с помощью молекулярной динамики показал, что в вязких средах растет вероятность образования оптимальной для катализа конформации этого аминокислотного остатка, что и является причиной возрастания квантового выхода люминесценции. Рожко с соавт. [20] отметили, что торий является одним из самых распространенных фонообразующих элементов в



Рис. 1. Участники X съезда РФО и конференции «Современные проблемы фотобиологии».

природе. При изучении действия его излучения на биологические объекты и возможной роли в этом процессе гуминовых веществ в качестве модели выбрали биолюминесцентный ферментативный биотест. Обнаружено, что торий активировал интенсивность люминесценции в течение первых 50 мин, причем после этого периода наблюдалось значительное возрастание активных форм кислорода. Гуминовые вещества нейтрализовали активирующее воздействие тория на люминесценцию и снижали содержание активных форм кислорода, нейтрализуя таким образом действие тория. Летута с соавт. [21] изучали кинетику замедленной флуоресценции и фосфоресценции эритрозина во фрагментах нормальных тканей и злокачественных опухолей молочной железы. Показано, что кинетика замедленной флуоресценции формировалась как суперпозиция сигналов термоактивированной люминесценции и свечения вследствие синглет-триплетной аннигиляции возбужденного эритрозина и синглетного кислорода. Установлена корреляция параметров замедленной флуоресценции и характеристик опухолей, что может быть использовано в оптической экспресс-диагностике тканей.

Андреева с соавт. [22] изучали влияние генистеина, вторичного метаболита растений из группы изофлавонов, на структуру хроматина. Было установлено, что генистеин не влиял на структуру нуклеосом в коровой области, но при этом в высокой концентрации был способен сблизать линкерные участки ДНК между собой. При высокой концентрации генистеин затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1, но не вызывает диссоциации линкерного гистона H1.0.

Секция 7 не представлена статьями в данном выпуске, хотя на съезде было 2 пленарных и 8 устных докладов. Следует отметить, что эта секция во многом была представлена докладами с фотобиотехно-

логической направленностью. **Фотобиотехнология — это пограничная между биологией и техникой отрасль науки и сфера практики, посвященная использованию фотобиологических процессов и систем в различных отраслях деятельности человека.** Поэтому она является составной частью фотобиологии.

Восьмая секция представлена четырьмя статьями в данном выпуске, причем на съезде было 2 пленарных, 8 устных и 2 стендовых докладов. Волгушева с соавт. [23] изучали действие кадмия на фотосинтез микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* путем анализа ОЖР кривых индивидуальных клеток. Обнаружено, что адаптация первичных реакций фотосинтеза микроводорослей к действию кадмия сопровождалась появлением в культуре двух фракций клеток. Клетки первой фракции сохраняли умеренную активность ФСII за счет уменьшения размера антенны ФСII, в то время как клетки второй фракции обладали низкой фотохимической активностью ФСII, сохраняя размер антенны близкий к размеру в контрольных клетках. Лабунская с соавт. [24] изучали спектральный состав света на разных глубинах водоемов и пигментный состав обитающих на этих глубинах фотосинтезирующих микроорганизмов. В меромиктических водоемах фотическая зона была ограничена окрашенной прослойкой воды с массовым развитием фототрофных микроорганизмов. Их пигментный состав хорошо согласуется со спектральным составом проходящего света. Эти и другие данные свидетельствуют, что спектральный диапазон может служить селективным фактором, определяющим состав сообщества фототрофов со структурно различными антеннами, но схожими спектрами поглощения света. Никулина с соавт. [25] изучали воздействие таких факторов, как pH, температура и облучение длинноволновым ультрафиолетом ($\lambda = 366$ нм) на характеристики препарата фага RB49, содержащего

трансдуцирующие частицы с плазмидной ДНК рTurboGFP-B и вирулентные частицы с собственной ДНК. Авторы предполагают, что трансдуцирующие частицы фага RB49 могут быть более устойчивы к действию длинноволнового ультрафиолетового излучения и воздействию низких температур, чем вирулентные. Схожие процессы могут происходить и в хорошо освещенных водоемах, в том числе холодных, в которых могут встречаться фаги, родственные RB49. Саковина с соавт. [26] представили обзор литературных данных в области создания фоточувствительных направляющих РНК и их использования в системах редактирования генома CRISPR. На основе литературных данных авторы полагают, что создание CRISPR/CAS с повышенным временем жизни в клетках, высокой эффективностью и специфичностью действия, а также возможностью регуляции активности, в частности светом, является актуальным направлением в области геномного редактирования.

К сожалению, не все российские исследователи, работающие в области фотобиологии, присоединились к РФО. Тем не менее, X съезд РФО с конференцией «Современные проблемы фотобиологии» стали важным этапом, подводящим итоги двухлетних исследований фотобиологов. На этой встрече ученые смогли обменяться не только результатами исследований, но и мнениями по актуальным вопросам фотобиологии, а также наметить способы объединения для проведения совместных исследований. Коллективный снимок участников съезда представлен на рис. 1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Koppel L. A. and Krasnovsky Jr. A. A. Thirty years of the Russian Society for photobiology (1992 to 2022). *Biophys. Rev.*, **14** (4), 751–753 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00987-x
- X Съезд Российского фотобиологического общества. Конференция «Современные проблемы фотобиологии». Материалы съезда (ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, 2023).
- 10th International Conference “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019” in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum Eds. *Suleyman Allakhverdiev, Ilya Naydov* (Saint Petersburg, Russia, 2019).
- Дегтерева Н. С., Плюснина Т. Ю., Хрушев С. С., Червицов Р. Н., Воронова Е. Н., Антал Т. К., Ризниченко Г. Ю. и Рубин А. Б. Оценка гетерогенности антенны и активности кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II методами математического анализа. *Биофизика*, **69** (3), 486–497 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030072
- Пашенко В. З., Лукашев Е. П., Мамедов М. Д., Гвоздев Д. А., Корватовский Б. Н., Нокс П. П. и Страховская М. Г. Влияние катионных антисептиков на спектральные характеристики и транспорт электрона в изолированных фотосинтетических комплексах фотосистем I и II. *Биофизика*, **69** (3), 515–526 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030098
- Петрова А. А., Casazza A. P., Santabarbara S. и Черепанов Д. А. Фотохимическое преобразование энергии дальнего красного света в реакционных центрах фотосистемы I из цианобактерии *Acaryochloris marina*. *Биофизика*, **69** (3), 498–514 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030084
- Золин Ю. А., Сухова Е. М. и Сухов В. С. Измерения фотохимического индекса отражения как инструмент дистанционного мониторинга фотосинтетических параметров растений. *Биофизика*, **69** (3), 603–614 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030169
- Ветошкина Д. В., Николаев А. А. и Борисова-Мубаракшина М. М. Антиоксидантные свойства растительного пластохинона *in vivo* и *in vitro*. *Биофизика*, **69** (3), 527–543 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030108
- Иванов Б. Н. и Руденко Н. Н. Участие карбоангидраз хлоропластов высших С3 растений в адаптационных изменениях фотосинтетических реакций. *Биофизика*, **69** (3), 466–477 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030055
- Попова А. Ю., Золин Ю. А., Сухов В. С., Сухова Е. М. и Юдина Л. М. Влияние комбинации локального умеренного нагрева и освещения на показатели водного обмена интактных частей пшеницы, измеренные тепловизионным методом. *Биофизика*, **69** (3), 615–626 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030171
- Ноев А. Н., Коваленко С. Г., Гатаулина Э. Д., Турчанинова Е. А., Джабраилов В. Д., Аитова А. А., Лихобабина Д. А., Сутемьева Ж. А., Фролова Ш. Р., Руппель Л. Э., Минаков Д. А., Суворов Н. В., Островерхов П. В., Васильев Ю. Л., Николаев М. В., Цвеляя В. А., Агладзе К. И. и Грин М. А. Блокаторы потенциал-зависимых натриевых каналов на основе азобензола с управляемой светом местно-анестетической и антиаритмической активностью. *Биофизика*, **69** (3), 574–593 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030144
- Бучарская А. Б., Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Маслякова Г. Н., Хлебцов Б. Н., Хлебцов Н. Г., Генин В. Д., Генина Э. А. и Тучин В. В. Комбинированная фотодинамическая и плазмонная фототермическая терапия в модели крыс с перевитыми опухолями. *Биофизика*, **69** (3), 656–663 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030205
- Ковш И. Б. Что такое фотоника? Лазер-Информ, **11–12**, 674–675, (2020).
- Пузырь А. П., Посохина Е. Д., Тимофеев А. А., Буоров А. Е., Медведева С. Е. и Павлов И. Н. Уникальные особенности люминесцентного гриба *Mycena gombakensis*. *Биофизика*, **69** (3), 594–602 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030154

15. Ломакина Г. Ю., Каминская С. С. и Угарова Н. Н. Биоломинесцентная система люциферазы светляков для изучения кинетики действия гентамицина на живые клетки *E. coli*. *Биофизика*, **69** (3), 565–573 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030138
16. Ронжин Н. О., Посохина Е. Д., Ле В. М., Могильная О. А., Захарова Ю. В., Сухих А. С. и Бондарь В. С. Эффекты кофейной кислоты, гиспидина и обнаруженного стимулирующего компонента на свечение мицелия и люминесцентной системы базидиомицета *Neonothopanus nambi*. *Биофизика*, **69** (3), 557–564 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030128
17. Малышева В. В., Степанова Л. В., Вышедко А. М., Бельская Л. В., Сарф Е. А., Халжанова З., Коленчукова О. А. и Кратасюк В. А. Влияние состава слюны на интегральный биоломинесцентный показатель ферментативного биотеста при интенсивных физических нагрузках организма. *Биофизика*, **69** (3), 664–673 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030215
18. Степанова Л. В., Коленчукова О. А., Жукова Г. В., Сутормин О. С. и Кратасюк В. А. Применение биоломинесцентного ферментативного биотеста для анализа слюны работников железнодорожного транспорта в мониторинге функционального состояния организма в условиях трудовой деятельности. *Биофизика*, **69** (3), 674–683 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030224
19. Лисица А. Е., Суковатый Л. А., Кратасюк В. А. и Немцева Е. В. Влияние вязких сред на квантовый выход биоломинесценции в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. *Биофизика*, **69** (3), 455–465 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030047
20. Рожко Т. В., Колесник О. В., Сачкова А. С., Романова Н. Ю., Стом Д. И. и Кудряшева Н. С. Воздействие тория-232 на биоломинесцентную ферментативную систему и радиопротекторная активность гуминовых веществ. *Биофизика*, **69** (3), 444–454 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030034
21. Летуга С. Н., Ишемгулов А. Т. и Сенчукова М. А. Кинетика длительной люминесценции эритрозина в тканях молочной железы *in vitro*. *Биофизика*, **69** (3), 647–655 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030191
22. Андреева Т. В., Ефременко А. В., Феофанов А. В., Любителев А. В., Коровина А. Н., Студитский В. М., Малюченко Н. В. Влияние генистеина на структуру нуклеосом и образование комплексов с PARP1. *Биофизика*, **69** (3), 432–443 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030024
23. Волгушева А. А., Конюхов И. В. и Антал Т. К. Адаптация первичных реакций фотосинтеза в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* к действию кадмия: анализ гетерогенности популяции. *Биофизика*, **69** (3), 478–485 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030063
24. Лабунская Е. А., Воронов Д. А., Лобышев В. И. и Краснова Е. Д. Подводные измерения спектров проходящего света в стратифицированных водоемах Беломорского побережья как ключ к пониманию пигментного состава фототрофов в зоне хемоклина. *Биофизика*, **69** (3), 627–646 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030188
25. Никулина А. Н., Никулин Н. А. и Зимин А. А. Исследование влияния физико-химических факторов на частоту трансдукции плазмид бактериофагом RB49. *Биофизика*, **69** (3), 544–556 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030117
26. Саковина Л. В., Горленко Е. С. и Новопашина Д. С. Фоторегулируемые на уровне направляющей РНК системы CRISPR/Cas9. *Биофизика*, **69** (3), 421–431 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924030012

Photobiology in Russia

A.A. Tsygankov*, **M.M. Borisova-Mubarakshina***, **E.S. Vysotsky****, **A.E. Solovchenko*****,
N.V. Suvorov****, and **V.V. Tuchin*******, *****

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

***Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

****MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

*****Saratov State University, Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia

*****Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

Photobiology is a dynamically developing field of knowledge and practical activity. The Russian Photobiological Society promotes the development of creative activity and communication of scientists and practitioners in the field of photobiology and related disciplines. In September 2023, the X Congress of the Russian Photobiological Society took place. The article provides definitions of photobiology, biophotonics, photobiotechnology, and bioluminescence. A brief history of the Russian Photobiological Society is described, as well as an overview of the program and results of the X Congress, including a summary of articles prepared based on the materials of reports at the Congress, the topics closest to biophysics.

Keywords: photobiology, biophotonics, photobiotechnology, Russian Photobiological Society, Congress of the Russian Photobiological Society