

УДК 577.3;577.175;576.08;543.426;612.014

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ: ПРИСУТСТВИЕ АЗУЛЕНОВ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ

© 2023 г. В. В. Рощина^a, *, В. А. Яшин^a, А. Р. Куньев^a

^aИнститут биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: roshchinavic@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 21.05.2023 г.

Принята к публикации 24.05.2023 г.

Исследованы спектральные свойства поверхности растительных клеток различного эволюционного уровня от одноклеточных (диатомовых водорослей, спор хвоща и папоротника) до многоклеточных (древесных и травянистых видов) организмов. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки ряда анализированных растений включали антиоксиданты — синие пигменты азулены. С помощью гистохимических методов обнаружено, что здесь также могут присутствовать нейротрансмиттерные соединения (биогенные амины), выделяемые в виде экскретов всей поверхностью или из специализированных секреторных структур листьев. В условиях высокой концентрации соли наблюдается выделение слизи, содержащей дофамин и гистамин, что блокируется добавлением экзогенного азулена и проазулена гроссегмина. Предполагается, что азулен поверхности защищает ее от образующихся активных форм кислорода и токсичных в высоких концентрациях биогенных аминов.

Ключевые слова: азулены, биогенные амины, поглощение, секреторные клетки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0233475523050079, **EDN:** TDZFSZ

ВВЕДЕНИЕ

Поверхность клеток растений чувствительна к изменениям концентрации тропосферного озона, засолению, травмирующим факторам и др. В качестве защиты выделяются разнообразные соединения в жидкой форме (фенолы, терпены, алкалоиды), а иногда и откладываются на поверхности. Выделение может происходить всей поверхностью или через специальные секреторные структуры [1]. Воспринимают внешние сигналы в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы, и они должны создавать защиту от проникновения токсичных веществ к плазмалемме и вглубь клетки. Общепринято, что антиоксидантной защитой растительных поверхностей обладают фенолы растительных экскретов и даже фенольные компоненты клеточной стенки. Недавно внимание было обращено на синие пигменты поверхности — азулены. С присутствием азуленов связан голубой цвет растений, который может принадлежать этим пигментам у некоторых травянистых и древесных видов [2].

Особое место в составе жидких секретов, выделяемых клеткой, могут занимать сигнальные соединения, известные как нейротрансмиттеры

животных — ацетилхолин и биогенные амины: катехоламины, серотонин, гистамин (они есть у всех организмов и имеют также название биомедиаторы) [3]. Во многих случаях появление биогенных аминов является реакцией на факторы окружающей среды. В выделениях одноклеточных спор хвоща появляются биогенные амины под влиянием засоления [4] или озона [5]. В данный момент изучаются и экзогенные аллювиальные эффекты дофамина на растения, подвергшиеся абиотическому повреждению факторами, влияющими на физиологическое состояние целых растительных организмов [6, 7]. Также есть первые данные, связанные с выделением гистамина и дофамина харовыми водорослями [8]. Стоит отметить, что на клеточную оболочку могут попадать экзогенные нейротрансмиттеры, выделяемые животными, растениями и микроорганизмами [8, 9]. Химические взаимодействия между различными живыми организмами (растениями, животными, микробами) с помощью этих веществ могут играть важную роль в регуляции биоценоза, в том числе свидетельствуют о стрессе растительного организма, где участвуют биогенные амины и ацетилхолин [10].

Используя спектральные методы анализа на модельных одноклеточных и многоклеточных системах организмов, в данной статье сделана попытка рассмотреть роль азуленов на поверхности растительной клетки во взаимодействии с сигнальными соединениями, такими как нейротрансмиттеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты. В качестве объектов исследований были выбраны одноклеточные и многоклеточные модели: виды, стоящих на разных ступенях эволюции. Первые представлены диатомовыми водорослями *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compere (Bacillariophyta, линия 2-903), культивируемые в сосудах объемом 100 мл на питательной среде, которая включала в мкг/л: 6.63 KH_2PO_4 , 6.51 CaCl_2 , 3.47 NaCl , 5 MgCl_2 и 2 мкг/л силикагеля (Merck, Австрия) в качестве источника кремния [11]. Также анализировали одноклеточные вегетативные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense* L. (сем. Equisetaceae) и папоротника листовика (кошеница) сколопендрового *Asplenium scolopendrium* L. (Newman) (сем. Aspleniaceae), культивируемые в лаборатории на предметных стеклах в чашках Петри на питательной среде, как описано ранее [12]. Вторая группа моделей включает образцы с голубой или серебристой поверхностью, собранные в 2020–2022 годах. Это были виды средней полосы России: как травянистые (райграс пастбищный *Lolium perenne* L. и клевер белый *Trifolium repens* L.), так и древесные (кустарники облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. и ивы белой *Salix alba* L.), собранные в мае–июне на побережье реки Оки ботанического заказника г. Пущино. Также в качестве образцов использовали южные виды: хвою и шишкостой можжевельника высокого *Juniperus excelsa* Bieb. из Карадагского заповедника (Феодосия, Крым) и можжевельника среднего *Juniperus pfitzeriana* 'Blue Cloud' (*Juniperus x media* 'Blue Cloud') из семейства Cupressaceae из Национального парка-дендрария (г. Сочи), собранных в октябре и январе–феврале, листья эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. Ex. Benth (сем. Myrtaceae) с серебристой поверхностью и листья лавра благородного *Laurus nobilis* L. (сем. Lauraceae) из парка Южные культуры (г. Адлер), собранные в сентябре.

Спектральные методы. Поглощение, собственную флуоресценцию клеток до и после гистохимической обработки (см. гистохимический анализ) измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометра Unicam Helios-Epsilon (США), микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Россия) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции произ-

водили ультрафиолетовым светом с длиной волны 360–380 нм или лазером – 458 нм.

Положение максимумов в спектрах поглощения интактных поверхностей клеток, регистрируемых с помощью микроспектрофотометра МСФ-15, определяли согласно опции дифференцирования спектров отражения по Золотареву [13].

Фотографировали живые клетки до и после гистохимической обработки с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica Microsystems), конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 с камерой Levenhuk M300 Base (США). Изображение листьев в проходящем свете получали с помощью микроскопа Invitro Evos M500 (Thermo Fisher Scientific, США). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95% этанолом из клеток (1 : 10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 ч и более) в 1–0.5 см кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Германия) и спектрофлуориметра Perkin Elmer 350 MPF-44B (Великобритания).

Определение азуленов. Азулены в экстрактах образцов 95% этанолом и ацетоном в течение 10–30 мин экспозиции определяли спектрофотометрически при 580 нм, как описано ранее [2]. Среднюю ошибку опыта из трех–четырех повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля соответственно.

Гистохимический анализ на биогенные амины. Флуоресцентное гистохимическое определение биогенных аминов (дофамина, гистамина и серотонина) в клетках проводили согласно методам, первично описанным для клеток животных и применяемым также для растительных клеток [14, 15]. Микроспоры наносили на предметное стекло и смачивали каплями 0.5–1% растворов веществ: для определения дофамина глиоксиловой кислотой, гистамина – орто-фталевым альдегидом и серотонина – формальдегидом. Гистохимические реакции повторяли (до 3–5 раз). Автофлуоресценция и флуоресценция после гистохимического окрашивания биогенных аминов (см. спектральные методы) использовались в качестве тест-реакций клеток на предметных стеклах (слайдах). Все эксперименты проводились при комнатной температуре (20–22°C). После 10–20 мин окрашивания реагентом образцы сушили при 50–80°C в течение 5–10 мин. Флуоресцентные реакции формирующих продуктов изучали под микроскопом Leica DM6000B или камерой Levenhuk M300 при возбуждении светом длиной волны 360–380 нм. Спектры флуоресценции регистрировались микроспектрофлуориметром МСФ-15. Интенсивность флуоресценции

при 460 нм выражали статистически со стандартной ошибкой.

Электронный транспорт при фотосинтезе. Для анализа донорных свойств азулена проводили его испытание на электронный транспорт с NADP^+ [16], в модели изолированных хлоропластов *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (сем. Crassulaceae), не содержащих природных азуленов [17] в отличие от хлоропластов гороха и клевера, которые содержат эти пигменты [18]. Кроме того, небольшое количество хлорофилла позволяло наблюдать за синей окраской азулена в реакционной среде. В классических вариантах пластид гороха или шпината нециклический перенос электронов лучше наблюдался при возбуждении светом 650–660 нм, в то время как циклический транспорт при 700–719 нм. В нашей модели хлоропласты из каланхоэ показали фотохимическую активность с фильтрами 550–555 нм, а данные, полученные с интерференционными фильтрами 650 нм, 670 нм и 706 нм, были аналогичными, но с более низкими скоростями восстановления акцепторов [17]. Использовали 0.9 мкмоль/мл NADP^+ , 0.1 мг/мл ферредоксин из гороха, 10^{-6} М диурон или 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина, 10^{-5} М антимицин А. Актинический свет (интенсивность светового потока $38 \text{ к эрг см}^{-2} \text{ с}^{-1}$) проходил через интерференционный фильтр 550 нм. Количество NADPH выражено статистически со стандартной погрешностью. Взаимодействие азулена (2 мг/мл) с выделенными компонентами электрон-транспортной цепи (2 мг/мл) осуществляли на препаратах цитохрома C_{553} (цитохром f) из клеток водоросли *Chlorella*, пластоцианина, ферредоксина и ферредоксин-NADP-редуктазы из хлоропластов гороха [17].

Реагенты. В работе использовали азулен и глиоксилевую кислоту (Fluka, Австрия/Германия), орто-фталевый альдегид, формальдегид, дофамин, гистамин, серотонин (ICN Biomedical/Pharmaceuticals, США), NADP^+ (Sigma-Aldrich, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для рассмотрения роли поверхности клеток в модельных системах одноклеточных и многоклеточных организмов были применены спектральные и гистохимические методы.

Исследование поверхности разных типов клеток спектральными методами. Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала и может также быть защитным барьером, если включает соответствующие компоненты, защищающие клетку от любого повреждения. С помощью микроскопии в проходящем свете и люминесцентной микроскопии, включая микро-спектрофлуориметрию/микроспектрофотометрию и лазер-сканирующую конфокальную микроско-

пию, мы исследовали различные модельные растительные клетки от низших организмов на эволюционной лестнице, одноклеточных: диатомовая водоросль *Ulnaria ulna*, вегетативные одноклеточные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense* и папоротника костенца сколопендрового *Asplenium scolopendrium* до высокоорганизованных многоклеточных покрытосеменных растений, получая их изображения (рис. 1) и спектры поглощения (рис. 2). На рис. 1 показан внешний вид поверхности растительных клеток у видов, стоящих на разных ступенях эволюции. С помощью микроскопии в проходящем свете и при возбуждении светом, вызывающим флуоресценцию объекта, в модельной системе одноклеточных почти бесцветных диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* мы смогли оценить состояние поверхности, лишь возбуждая флуоресценцию хлорофилла светом 430 нм (рис. 1а). Если красное свечение не наблюдается, то данная клетка мертва, и флуоресцируют зеленым светом твердые оболочки-панцири, пропитанные соединениями кремния [11]. У непроросшей вегетативной микроспоры хвоща *Equisetum arvense* в проходящем свете и при возбуждении светом 430 нм внешний слой твердой оболочки-эскины светится в голубой или синезеленой области и только у развивающейся клетки появляется красное свечение, а оболочка сбрасывается, когда начинается развитие клетки (рис. 1б). На более высокой ступени эволюции у папоротников в отличие от хвоща споры уже не имеют такой прочной оболочки, а заключены в спороносы с твердой оболочкой, что флуоресцирует зелено-желтым при возбуждении светом 430 нм, а споры внутри — зеленым (рис. 1в). Проросшая спора долго, до недели после смачивания спороносца, светится зеленым с максимумом 530 нм, пока в спектре флуоресценции не появится еще и максимум 680 нм, относящийся к уже синтезированному хлорофиллу.

Поверхность клетки диатомовых водорослей и споры хвощей — это плотный целлюлозный панцирь, включающий соединения кремния. У папоротника все споры заключены в спороносец, поверхность которого тоже представляет собой твердую оболочку, но такого панциря как у клеток диатомовых и спор хвоща у папоротника нет. У всех трех моделей неразвившихся клеток (диатомовых водорослей, хвоща и папоротника) светится зеленым поверхность клеток (максимум 520–530 нм). Хлорофилл синтезируется и обычно просвечивается красным светом изнутри клетки после начала развития. В отличие от листьев вышших растений эвкалипта *Eucalyptus cinerea* и облипихи *Hippophae rhamnoides* сухие непроросшие споры хвоща и папоротника не имеют хлорофилла, что видно у них по отсутствию красной флуоресценции [12].

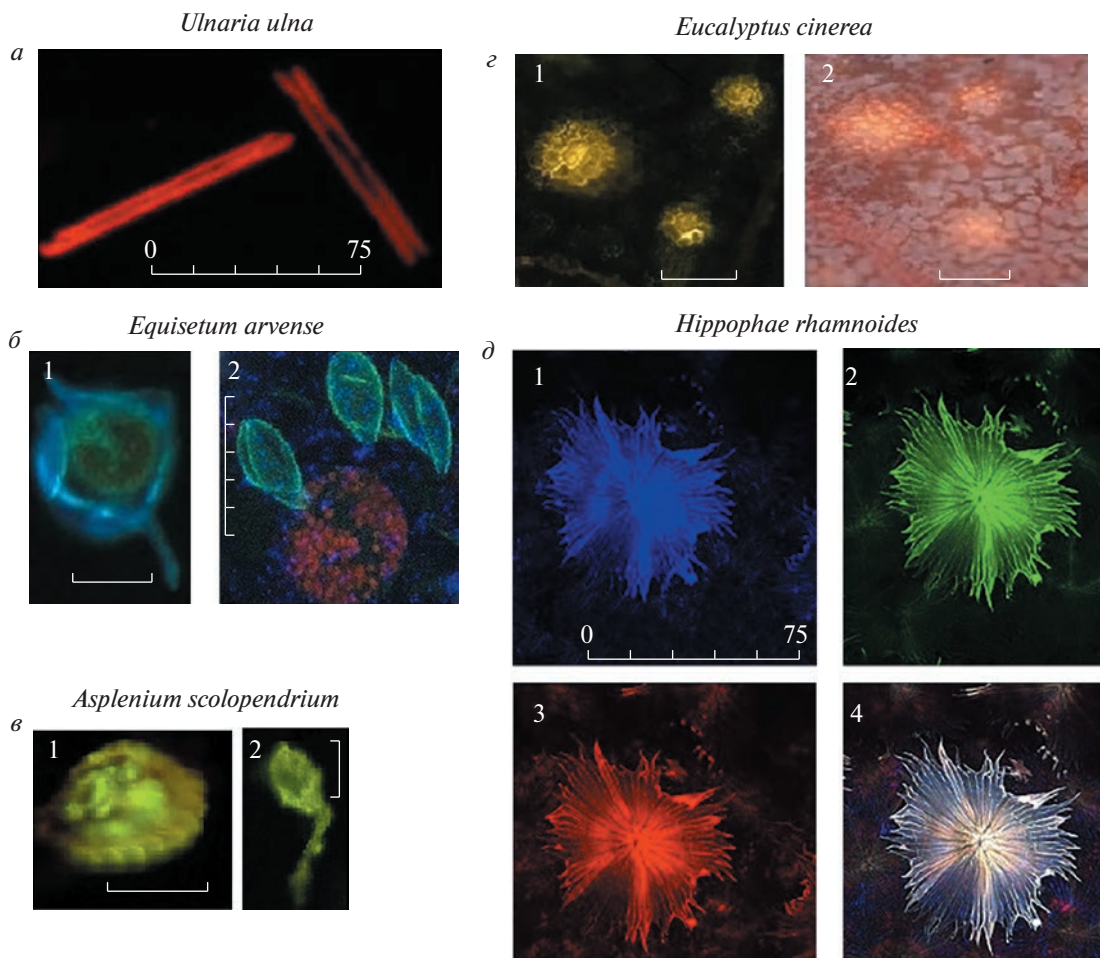


Рис 1. Изображения поверхности растительных объектов: флуоресцирующие при возбуждении светом 430 нм клетки диатомовой водоросли *Ulnaria ulna* (а) и вегетативные споры хвоща полевого *Equisetum arvense* (б), спороносец (1) и споры (2) папоротника *Asplenium scolopendrium* (в), листья *Eucalyptus cinerea* (г) в проходящем свете микроскопа Leica DM6000 В (где зеленовато-желтые масляные железы видны на темно-зеленой поверхности) и микроскопа Invitro Evos M5000 (где синие восковые пластины покрывают всю поверхность листа, включая желтые секреторные клетки желез). д — полученные с помощью конфокального микроскопа изображения возбуждаемой лазером 458 нм автофлуоресценции поверхностных желез облипихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides*: 1 — в синем (488–500 нм), 2 — зеленом (505–540 нм), 3 — красном (580–700 нм) каналах и 4 — наложение изображений из 3 каналов (сумма). Масштаб, мкм: 75, 25, 100 и 20, 100, 75 для а, б, в, г, д соответственно.

У многоклеточных моделей покрытосеменных растений (рис. 1г, 1д) нет таких плотных клеточных оболочек, но есть специальные секреторные структуры. У эвкалипта пепельного желто-зеленые секреторные железы хорошо видны в проходящем свете (рис. 1г, изображение 1 слева), и они флуоресцируют в зеленой области спектра [2, 15]. Более того, в проходящем свете на рис. 1г (изображение 2 справа) заметны голубоватые восковые пластины, покрывающие как эти железы, так и всю поверхность листа вне секреторных клеток. По-видимому, это пластины азуленов, ранее обнаруженных у этого вида в этанольных или ацетоновых 10 мин смывах листьев [2]. Лазер-сканирующая конфокальная микроскопия показала, что флуоресценция в сине-зеленом свете свойствен-

на и многоклеточным железам на поверхности листьев облипихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* (рис. 1д). Флуоресцентные методы дают возможность по автофлуоресценции показать строение клеточной поверхности, как мы видим, по эмиссии в голубой и сине-зеленой области спектра, и оценить жизнеспособность клеток, главным образом, по наличию хлорофилла внутри клеток.

Какие именно соединения находятся на поверхности клеток, и как это может быть связано с выделением секреторных продуктов, до сих пор мало изучено. В предыдущей работе, посвященной показателям устойчивости к озону, внимание привлекли древесные растения с голубой или серебристой окраской поверхности, где были обна-

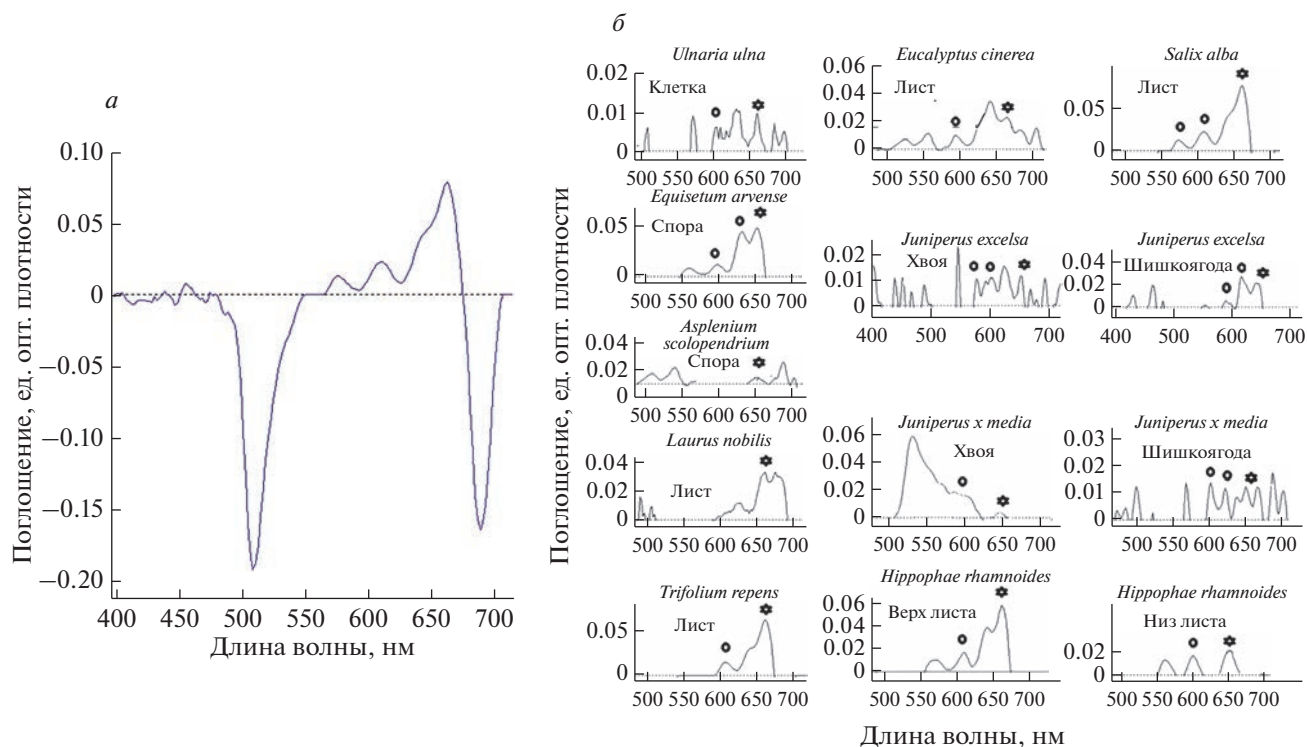


Рис. 2. Спектры поглощения поверхности различных растений (первая производная кривых для выявления максимумов). *a* — Исходный образец для листа *Salix alba*; *b* — верхние части графиков для использованных видов. Предполагаемые максимумы азуленов отмечены кружками, а максимум хлорофилла — звездочками.

ружены азулены [2]. Обычно для такого анализа требовалось много материала. Изображение поверхности листа эвкалипта в проходящем свете (рис. 1*з*) с помощью микроскопа Invitro Evos M5000 позволило увидеть азуленсодержащие восковые пластинки. Мы предположили, что максимумы их поглощения можно увидеть и в спектрах неповрежденных листьев. В данной работе для этой цели использовали микроспектрофотометр, чтобы получить данные по спектрам поглощения с поверхности объектов (рис. 2).

В спектре поглощения поверхности можно обнаружить максимумы, свойственные различным соединениям (400–460 нм — терпеноиды, 500–530 нм — фенолы, 570–620 нм — азулены и 660–666 нм — хлорофилл) [18]. Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофотометре/микроспектрофлуориметре имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения согласно работе [13]. Пример такого метода показан на рис. 2*а* для образца ивы белой *Salix alba*. Для выявления максимумов в области 550–670 нм достаточно было представить информацию с положительными значениями (верх графика), что сделано на рис. 2*б* для всех образцов.

Первая производная от спектра внешнего отражения для полос малой интенсивности позво-

лила непосредственно определить присутствие в спектрах после дифференцирования характерные для азуленов и хлорофилла максимумы: 580–620 и 660–666 нм соответственно (рис. 2). В спектрах поглощения бесцветных в проходящем свете диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* (рис. 2) наряду с максимумом хлорофилла, есть максимум 600–610 нм. У некоторых бурых водорослей азулены также найдены [19]. У синеватых вегетативных микроспор хвоща *Equisetum arvense*, содержащих азулены [18], отчетливо видны максимумы 610 нм и 612 нм, свойственные этим соединениям. Характерные для азуленов пики обнаружены в спектрах всех исследованных растений, кроме папоротника *Asplenium scolopendrium* и лавра *Laurus nobilis*. Принадлежность максимумов поглощения 580–630 нм мы далее подтвердили экспериментально с экстракцией азуленов в этаноле и ацетоне.

Азулены в экстрактах с поверхностями клеток. В табл. 1 приведены данные об азуленах изучаемых растений, вычисленных по интенсивности полос поглощения при 580 нм в 10 мин экстрактах — смывам с целой поверхности [2]. Прежде всего, присутствие азуленов в экстрактах подтвердило эксперименты по обнаружению характерных для синих пигментов максимумов в спектрах поглощения поверхностей клеток в области 580–610 нм (рис. 2). У спор папоротника *Asplenium* и листьев

Таблица 1. Содержание азуленов на поверхности листьев растений (10 мин экстракция этанолом)

Вид растения	Азулены, мг/г сырой массы
Хвощ полевой <i>Equisetum arvense</i> L., вегетативные споры	1.7 ± 0.02
Райграс пастбищный <i>Lolium perenne</i> L. (Graminae), листья	1.63 ± 0.07
Облепиха крушиновидная <i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Elaeagnaceae), листья	1.0 ± 0.06
Можжевельник высокий <i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb (Cupressaceae), хвоя	1.76 ± 0.03
Можжевельник средний <i>Juniperus pfitzeriana</i> (x <i>media</i>) 'Blue cloud' M. Bieb (Cupressaceae), хвоя	0.55 ± 0.01
Ива белая <i>Salix alba</i> L. (Salicaceae), листья	0.92 ± 0.04
Клевер белый <i>Trifolium repens</i> L. (Fabaceae), листья	0.41 ± 0.03

лавра *Laurus* такие максимумы в спектрах поглощения отсутствовали, не было и азуленов в их экстрактах. У придонной пресноводной диатомовой водоросли *Ulnaria ulna* подобные максимумы были, но в экстрактах органическими растворителями их сложно выделить. Принципиально важно, что у водорослей, в частности, бурых *Dicetyota dichotoma* [19] и придонных горгониевых обитателей Арктики [20], были найдены сесквитерпеновые лактоны азуленового ряда, обладающие способностью воздействовать на другие организмы. Они либо нарушали цепи питания насекомых, либо препятствовали развитию морских обитателей, которые вызывают обрастание днища судов.

При сравнении в табл. 1 оказалось, что у хвоща полевого, райграса, можжевельника высокого значения пигмента на мг сырой массы близки, тогда как у облепихи и можжевельника среднего за 10 мин экстрагируется значительно меньше азуленов. Вероятно, у последних видов пигмент присутствовал в более глубоких слоях кутикулы или даже клеточной стенки. Для всех исследованных видов характерна синяя или голубая окраска листьев. Из синеватых спор хвоща ранее был выделен один из азуленов, как и из хлоропластов клевера *Trifolium repens* [18]. Известно, что у некоторых можжевельников азулены находили в продуктах дистилляции эфирных масел [21]. Ранее присутствие азуленов показано в 10 мин спиртовых или ацетоновых экстрактах листовой поверхности у эвкалипта *Eucalyptus cinerea* и ряда хвойных растений с голубой поверхностью хвои, которые были устойчивы к озону [2]. Синие пигменты, как мы полагаем, служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием [22]. Именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у данных видов, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность к озону и активным формам кислорода. С присутствием азуленов связан голубой цвет поверхностей, который может принадлежать этим пигмен-

там у некоторых травянистых и древесных растений.

Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных [23, 24]. В модельных опытах на вегетативных микроспорах хвоща продемонстрированы антигистаминные свойства экзогенных азулена и проазуленовых сесквитерпенов [25].

Нейротрансмиттеры на поверхности клетки. На поверхность клетки могут выделяться эндогенные нейротрансмиттеры (можно рассматривать как физиологический ответ клетки на внешнее воздействие или внутриклеточную сигнализацию в направлении из клетки). Соединения, такие как дофамин и гистамин, могут быть у некоторых видов в норме, но часто появляются при стрессе. Они накапливаются под воздействием различных стрессовых факторов, как абиотических (ультрафиолетовое облучение, озон, засоление, засуха, дефицит питательных веществ и др.), так и биотических (повреждение насекомыми) в биоценозе [26, 27].

Биогенные амины были обнаружены нами гистохимическими методами по характерной флуоресценции при 460 нм в модельных системах организмов, непосредственно выделяющих их в природе: у одноклеточных диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* (Nitzsch) [11] и одноклеточных вегетативных микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* L. (сем. Equisetaceae) [14]. В табл. 2 сравнивается уровень трех биогенных аминов у указанной диатомовой водоросли и одноклеточной споры наземного растения папоротника *Asplenium scolopendrium*. У первого объекта в клетках преобладает дофамин, а меньше всего серотонина, тогда как у второго, судя по флуоресценции, оказалось больше гистамина, тогда как у споры отмечены близкие данные для дофамина и серотонина. В выделившемся секрете из споры серотонина значительно меньше, чем других изучаемых аминов.

Выделять биогенные амины могут и специализированные секреторные клетки поверхности (железы, волоски и др.), поскольку содержат ферменты, регулирующие их содержание, а также ан-

Таблица 2. Биогенные амины у диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* L. и вегетативных спор папоротника листовика обыкновенного *Asplenium scolopendrium* L.

Вид растения	Флуоресценция при 460 нм, усл. ед.			
	контроль, автофлуоресценция	после гистохимических реакций на соединения		
		дофамин	гистамин	серотонин
<i>Ulnaria ulna</i>	10.3 ± 0.1	60.7 ± 0.2	34.0 ± 7.0	14.4 ± 0.2
<i>Asplenium scolopendrium</i> L.				
спора	15.5 ± 0.2	39.2 ± 0.9	102.8 ± 4.0	32.6 ± 2
секрет	0	57.4 ± 6.0	71 ± 5	14.0 ± 2

тинейротрансмиттеры, вещества, уменьшающие токсическое действие нейротрансмиттеров или блокирующие рецепторы. У покрытосеменных растений, как показано для желез эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea*, биогенные амины могут выделяться как всей поверхностью листьев (дофамин), так специализированными секреторными структурами (гистамин) поверхности [28]. На рис. 3 видно ярко-желтое свечение, характерное для высоких концентраций дофамина [29] в секреторных железах лекарственного растения облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* после гистохимической обработки глукосиловой кислотой. Причем дофамин присутствует во всех частях чешуйчатой структуры. Напротив, в реакции на гистамин синее свечение наблюдалось только в середине многоклеточной железы. Появление биогенных аминов часто связывают со стрессом, и возможно, что это не только маркер стресса, но и в какой-то мере защитная реакция.

Эффекты экзогенного азулена на выделение биогенных аминов из клеток и возможные механизмы. Учитывая, что листья исследуемых видов содержат азулены в поверхностном слое, как мы показали выше (табл. 1), вероятно взаимодействие между азуленами и выделяющимися биогенными аминами. Чтобы оценить такую возможность, были проведены модельные опыты на одноклеточных вегетативных микроспорах хвоща (рис. 4), которые выделяют значительные количества биогенных аминов при солевом стрессе с 1% сульфатом натрия, как в природных условиях [4]. В модельных опытах на вегетативных микроспорах хвоща были ранее продемонстрированы антигистаминные свойства экзогенных азулена и проазуленовых сесквитерпенов [25]. На рис. 4 показано, что в таких же условиях обнаружено влияние азулена и проазулена гроссгемина и на содержание дофамина в клетках и выделяющемся секрете. Наибольший эффект снижения дофамина отмечен для проазулена гроссгемина и азулена из пяти изученных сесквитерпенов как в клетках, так и в секрете (рис. 4) в условиях засоления среды 1% сульфатом натрия, стимулирующего выход био-

генных аминов наружу. Биогенные амины в больших количествах могут быть токсичными для клетки.

Учитывая, что азулен и дофамин могут благодаря двойным связям вступать в окислительно-восстановительные реакции, мы провели эксперименты с их этанольными растворами (табл. 3), моделируя возможность их взаимодействия на поверхности клеток. Дофамин в высоких концентрациях в присутствии кислорода через цепь реакций — супероксид-анион радикал — пероксид может превращаться в токсичный красный дофаминохром с максимумом поглощения 480 нм. В спектрах поглощения наблюдали, происходят ли изменения при 480 нм (возможное увеличение и появление красной окраски, свойственное дофаминохрому) и при 580 нм (максимум поглощения азулена). Последовательность добавления реагентов была следующей: “Дофамин + азулен” или “Азулен + дофамин” в соотношениях по весу исходного вещества 3 : 1. В первом случае отмечали только увеличение поглощения при 580 нм, а во втором варианте наблюдали увеличение оптической плотности при 480 нм (возможное образование небольшого количества дофаминохрома) и снижение ее при 580 нм. Однако видимого изменения общей синей окраски смеси не происходило за короткое (5 мин) время наблюдения. Только через 24 ч происходит изменение окраски в варианте “Дофамин + азулен”: почти вдвое увеличилось поглощение при 480 нм и резко снижалось при 580 нм, так что синяя окраска стала мало заметной, а была уже видна слабо розовая окраска. В варианте “Азулен + дофамин”, когда концентрация азулена больше в 3 раза дофаминохром через 24 ч не образовался вообще (нет поглощения при 480 нм), но и синяя окраска азулена, судя по поглощению при 580 нм, исчезла. В вариантах с гистамином и серотонином изменения отслеживали только при 580 нм: от 5 мин инкубации до 2 ч, но значимых изменений не было.

Следует рассмотреть также электрохимические возможности взаимодействия. Согласно работам Племенкова с соавт. [30], окислительно-восста-

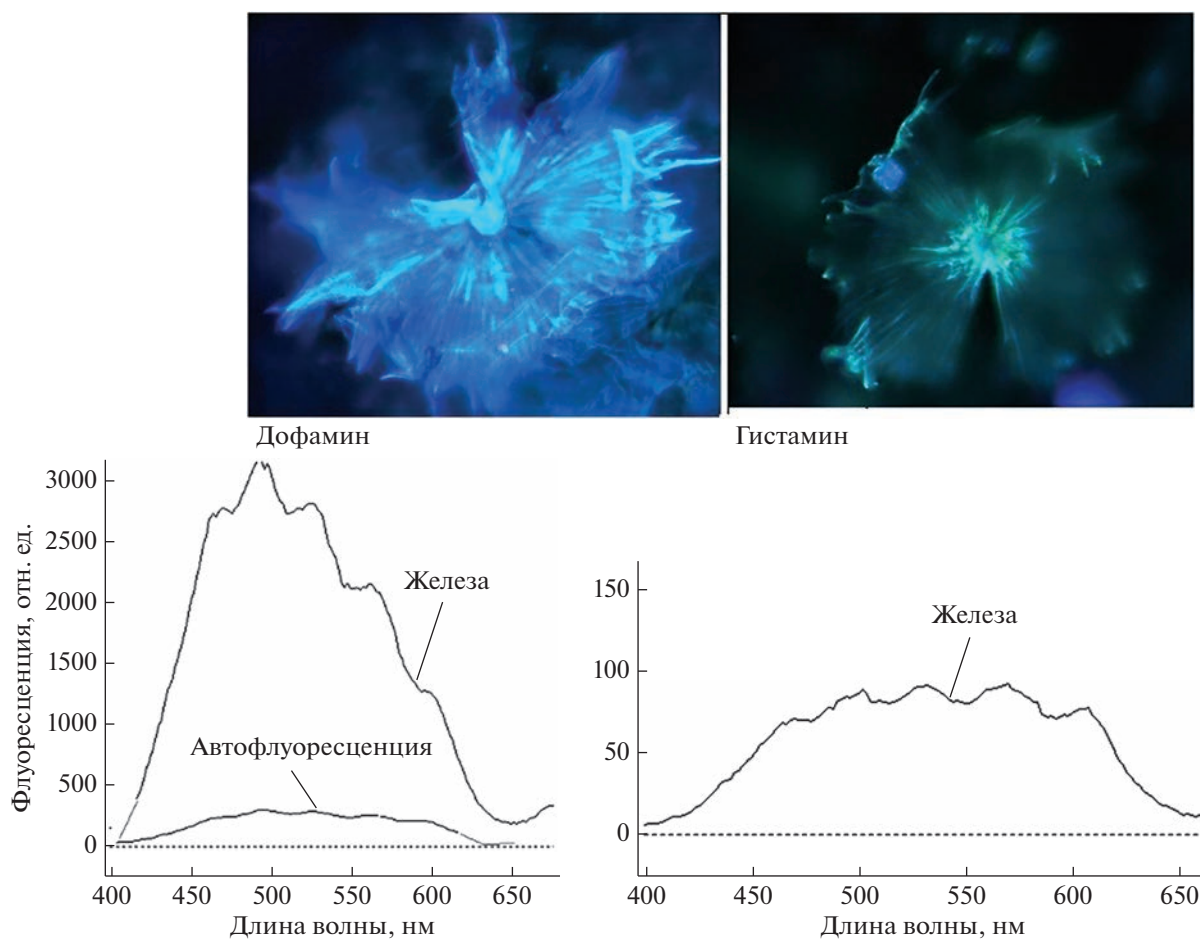


Рис. 3. Гистохимические реакции на дофамин и гистамин в секреторной чешуйке-железе листьев облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. Вверху — вид железы под люминесцентным микроскопом при возбуждении светом 360–380 нм. Внизу — спектры флуоресценции.

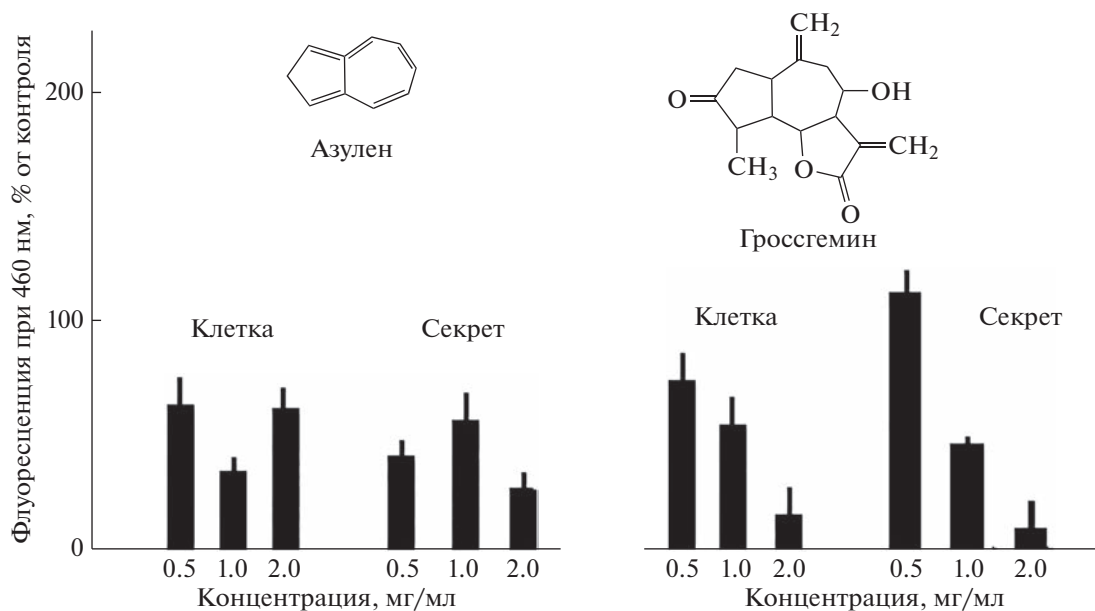


Рис. 4. Эффекты азулена и проазулена гроссгемина на содержание дофамина, оцениваемых по флуоресценции 460 нм после гистохимической обработки клеток вегетативных микроспор хвоща *Equisetum arvense* в условиях засоления 1% сульфатом натрия.

Таблица 3. Изменение интенсивности поглощения в исходных этанольных растворах азулена и дофамина. Кювета 0.2 см. Время после смешивания растворов 5 мин и 24 ч

Вещество	Спустя 5 мин		Спустя 24 ч	
	поглощение при длине волны		поглощение при длине волны	
	480 нм	580 нм	480 нм	580 нм
Дофамин (0.3 мг в 0.3 мл)	0.113	0.484	0.010	0.0
+ азулен (0.1 мг в 0.1 мл)	0.108	0.581	0.180	0.157
Азулен (0.3 мг в 0.3 мл)	0.120	0.961	0.0	1.27
+ дофамин (0.1 мг в 0.1 мл)	0.190	0.797	0.0	0.09

новительный потенциал азулена в ацетонитриле составляет +0.36 В. Пиковый ток соответствует переносу двух электронов на молекулу. В вольтаммограмме регистрируются два восстановительных пика при потенциалах +0.17 и +0.04 В. На изолированных хлоропластах гороха пара дофамин/аскорбат (дофамин в концентрациях, больших чем 10^{-5} М), способна восстанавливать окисленные цитохром f (редокс-потенциал +0.365 В) и пластоцианин (редокс-потенциал +0.37 В) [31] и быть донором электронов между цитохромом f и пластоцианином в электронтранспортной цепи. Синий азулен, если его добавили к раствору цитохрома f (цитохром C_{553}), выделенного из клеток хлореллы (соотношение реагентов по весу 1 : 1), становился бесцветным после потери электрона. Такая же, но более слабая реакция отмечена при взаимодействии с пластоцианином, изолированным из гороха. В смесях растворов азулена с индивидуальными ферредоксином, ферредоксин-NADP-редуктазой или NADP⁺ из-за их более отрицательных редокс-потенциалов, чем у синего пигмента, подобной реакции не происходило.

В модельных опытах на изолированных хлоропластах *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (fam. Crassulaceae), которые лишены природных азуленов, мы показали (табл. 4), что экзогенный азулен может являться донором электронов в электронтранспортной цепи фотосинтеза между цитохро-

мом f (+0.36 В) и пластоцианином (+0.37 В), участвуя в нециклическом (ингибируется диуроном) и циклическом (ингибируется антимицином А) транспорте электронов. В табл. 4 видно, что даже в случае блокады ингибитором диуроном или антимицином А азулен способен восстанавливать электронный транспорт, быть, по-видимому, донором электронов.

Присутствие азуленов в хлоропластах гороха и клевера [16], по-видимому, неслучайно, и является также защитным механизмом в случае повреждения, где азулен донирует электроны в электрон-транспортную цепь. Учитывая, что этот материал требует специального рассмотрения в другой публикации, мы отметим главное в возможном механизме взаимодействия между азуленом и дофамином на поверхности растительных клеток, что азулены (и, вероятно, проазулены) как антиоксиданты могут предотвращать или замедлять образование токсичного дофаминахрома. Для гистамина и серотонина, вероятно, существует другой механизм взаимодействия с азуленом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение люминесцентной микроскопии с модификациями лазер-сканирующей конфокальной микроскопии и микроспектрофлуориметрии/микроспектрофотометрии позволило получить сведения о поверхности различных видов на эволюционной лестнице — от панцирей диатомовых водорослей и твердых покровов вегетативных микроспор хвоща до листьев покрытосеменных растений. У значительного числа растений с синей или серебристой поверхностью в спектрах поглощения обнаружены максимумы 580–620 нм, характерные для синих пигментов азуленов, что подтверждается их появлением в 10 мин экстрактах этанолом или ацетоном. У большинства исследованных видов из клеток наружу могут выделяться биогенные амины — дофамин, гистамин и серотонин, известные как нейротрансмиттеры животных. Выделение происходит как всей поверхностью, так и специализированными секреторными структурами. Вероятно, что азуленовый

Таблица 4. Эффекты азулена (конечная концентрация 0.01 мг в 0.5 мл образца) на фотосинтетический электронный транспорт в изолированных хлоропластах *Kalanchoe pinnata*. Актинический свет 550 нм

Вариант	Образование NADPH, мкг/мг хлорофилла ч
Контроль	1.34 ± 0.02
+ Азулен	5.64 ± 0.05
+ Диурон	0.11 ± 0.04
Диурон + Азулен	3.82 ± 0.02
Антимицин А	1.12 ± 0.03
Антимицин А + Азулен	3.20 ± 0.02

слой (или слои) благодаря антиоксидантным свойствам служит определенным защитным фильтром от эндогенных и экзогенных биогенных аминов.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность и надежду на совместные исследования ботаникам, ведущим научным сотрудникам Сочинского дендрария и Карадагского заповедника в Крыму Г.А. Солтани и В.В. Фатерыге за предоставление образцов можжевельников и ценные консультации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнялась в рамках госпрограммы исследований 0116-2016-0004, раздел 61.3.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рощина В.Д., Рощина В.В. 1989. *Выделительная функция высших растений*. М.: Наука. 214 с.
2. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. 2022. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биол. мембраны*. **39** (1), 54–62.
3. Рощина В.В. 1991. *Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины*. Пушкино: Биологический центр РАН. 192 с.
4. Roshchina V.V., Yashin V.A. 2014. Neurotransmitters catecholamines and histamine in allelopathy: Plant cells as models in fluorescence microscopy. *Allelopathy J.* **34** (1), 1–16.
5. Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V. 2015. Fluorescent analysis for bioindication of ozone on unicellular models. *J. Fluorescence*. **25** (3), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1540-2>
6. Li C., Sun X., Chang C., Jia D., Wei Z., Li C., Ma F. 2015. Dopamine alleviates salt-induced stress in *Malus hupehensis*. *Physiol. Plantarum*. **153**, 584–602.
7. Liu Q., Gao T., Liu W., Liu Y., Zhao Y., Li W., Ding K., Ma F., Li C. 2020. Functions of dopamine in plants: A review. *Plant Signal. Behav.* **15** (12), 1827782. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1827782>
8. Roshchina, V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. 2019. Allelopathy experiments with Chara algae model. Histochemical analysis of the participation of neurotransmitter systems in water inhabitation. *Allelopathy J.* **46** (1), 17–24.
9. Oleskin A.V., Postnov A.L. 2022. Neurotransmitters as communicative agents in aquatic ecosystems. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* **77** (1), 6–12. <https://doi.org/10.3103/S0096392522010035>
10. Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C. 2021. Impact of biogenic amines on the growth of green microalgae. *J. Pharm. Nutr. Sci.* **1** (11), 144–150. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.17>
11. Roshchina V.V., Yashin V.A., Podunay Yu.A. 2022. Fluorescence in the study of diatom *Ulnaria ulna* cells. *Austin Environ. Sci.* **7**(3), 107–110.
12. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Яшин В.А., Карнаухов В.Н. 2002. Автофлуоресценция интактных спор хвоща *Equisetum arvense* L. в процессе их развития. *Биофизика* **7** (2), 318–324.
13. Золотарев В.М. 2012. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и спектроскопия*. **112** (1), 150–154.
14. Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V., Kulakov V.I. 2014. Fluorescent analysis of catecholamines and histamine in plant single cells. *Int. J. Biochem., Photon* **195**, 344–351.
15. Рощина В.В., Яшин В.А., Кучин А.В. 2016. Флуоресценция нейротрансмиттеров и их рецепция в растительной клетке. *Биол. Мембраны*. **33** (2), 105–112.
16. Акулова Е.А., Рощина В.В. 1977. Фотосинтетический электронный транспорт на уровне цитохрома f и пластоцианина. *Биохимия* **42** (12), 2140–2148.
17. Roshchina V.V. 2023. Plant leaf surface as a sensory system in allelopathic relations: Role of azulenes. *Allelopathy J.* **59** (2). <https://doi.org/10.26651/allele.j/2023-59-2>
18. Roshchina V.V. 2008. *Fluorescing World of Plant Secreting Cells*. Enfield, Jersey (USA), Plymouth: Science Publisher. 338 p.
19. Saleh M.A., Abdel-Moein N.M., Ibrahim N.A. 1984. Insect antifeeding azulene derivative from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *J. Agricultural Food Chem.* **32** (6), 1432–1434.
20. Cano L.P.P., Manfredi R.Q., Perez M., Garcia M., Blustein G., Cordeiro R., Perez C., Schejter L., Palermo J.A. 2018. Isolation and antifouling activity of azulene derivatives from the antarctic gorgonian *Acanthogorgia laxa*. *Chem. Biodivers.* **15**, e1700425.
21. Коновалов Д.А. 1995. Природные азулены. *Растительные ресурсы*. **31** (1), 101–130.
22. Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. 2022. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр. *Актуальные вопросы биол. физики и химии*. **7** (1), 36–39.
23. Bakun P., Czarzynska-Goslinska, B., Goslinski T., Lijewski S. 2021. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med. Chem. Res.* **30**, 834–846. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02701-0>
24. Murfin L.C., Lewis S.E. 2021. Azulene – a Bright core fore sensing and imaging. *Molecules*. **26** (2), 353–362. <https://doi.org/10.3390/molecules26020353>
25. Roshchina V.V., Konovalov D.A. 2022. Single cell plant model of *Equisetum arvense* for the study antihistamine effects of azulene and sesquiterpene lactones. *Future Pharm.* **2** (2), 126–134.
26. Gao T., Zhang Z., Liu X., Wu Q., Chen Q., Liu Q., van Nocker S., Ma F., Li C. 2020. Physiological and transcriptome analyses of the effects of exogenous dopamine on drought tolerance in apple. *Plant Physiol. Biochem.* **148**, 260–272.
27. Jiao C., Lan G., Sun, Y., Wang G., Sun Y. 2021. Dopamine alleviates chilling stress in watermelon seedlings

- via modulation of proline content, antioxidant enzyme activity, and polyamine metabolism. *J. Plant Growth Regul.* **40** (1), 277–292.
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10096-2>
28. Roshchina V.V. 2022. Biogenic amines in plant cell at norma and stress: Probes for dopamine and histamine. In: *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture. Roles in Stress Tolerance*. Eds Amsterdam: Elsevier Naeem M. and Tariq Aftab.p. 357–376.
29. Жимова Н.С., Любовцева Л.А., Гурьянова Е.А., Мулендиев С.В. 2007. Люминесцентно гистохимическое исследование гистамина в структурах кожи после обработки гиалуроновой кислотой. *Вестник Оренбургского гос. университета*. **6**, 109–117.
30. Племенков В.В., Янилкин В.В., Палей Р.В., Нго Бакопки Б., Морозов В.Н., Максимюк Н.Н. 2001. Реакции одноэлектронного окисления и восстановления сульфидов азуленового ряда. *Журн. орг. химии*. **71** (3), 494–500.
31. Roshchina V.V. 1990. Biomediators in chloroplasts of higher plants. 3. Effect of dopamine on photochemical activity. *Photosynthetica*. **24** (1), 117–121.

Spectral Characteristics of the Plant Cell Surface: Occurrence of Azulenes and Biogenic Amines

V. V. Roshchina¹, *, V. A. Yashin¹, A. R. Kunyev¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: roshchinavic@mail.ru*

Spectral properties of the surface of plant cells at various evolutionary levels from unicellular (diatoms, horsetail, and fern spores) to multicellular (woody and herbaceous species) organisms have been studied. It was shown that the surface layers of the cuticle and cell wall of a number of analyzed plants included antioxidants – blue pigments azulenes. Using histochemical methods, it was found that neurotransmitter compounds – biogenic amines – are present as excretions on the entire surface or specialized secretory structures of leaves. Under conditions of high salt concentration, dopamine and histamine are secreted, which is blocked by the addition of exogenous azulene and proazulene grosshemine. It is assumed that the azulene-containing surface protects cells from the formed reactive oxygen species and biogenic amines that are toxic at high concentrations.

Keywords: absorbance, azulene, biogenic amines, cell wall, fluorescence, secretory cells